

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Campus Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

**Mechanismen der Thymosin- β 4 - induzierten Gefäßneubildung
im ischämischen Kaninchen-Hinterlauf-Modell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Florian Tobias Gesenhues
aus Marburg
2016

*Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München*

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Gerd Juchem
Prof. Dr. Gunnar Schotta

*Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin:* Dr. med. vet. Rabea Hinkel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinischer Hintergrund	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Konventionelle Therapie	2
1.2	Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese	2
1.2.1	Vaskulogenese	2
1.2.2	Angiogenese	3
1.2.3	Arteriogenese	4
1.3	Neue Therapieansätze	5
1.3.1	Allgemein	5
1.3.2	Wachstumsfaktoren	5
1.3.3	Gentherapie	6
1.4	Adeno-assoziierte Viren (AAV)	7
1.4.1	Das Tet-Off- und Tet-On-System	9
1.5	Thymosin- β 4 (T β 4)	9
1.5.1	Allgemein	9
1.5.2	Die Funktion von Thymosin- β 4 im Zytosol	10
1.5.3	Thymosin- β 4 und Antiinflammation	10
1.5.4	Thymosin- β 4 in Angiogenese und Arteriogenese	11
1.6	Das Angiopoietin/Tie-Rezeptor-System	12
1.6.1	Allgemein	12
1.6.2	Angiopoietin 1	13
1.6.3	Angiopoietin 2	14
1.7	Stickstoffmonoxid (NO) und Arteriogenese	14
1.8	Fragestellung der vorliegenden Studie:	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Produktion rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren	16

2.1.1	Vorbereitung der Zellen für die Transfektion	16
2.1.2	Ernte und Aufreinigung der Viren	17
2.1.3	Lösung von Cäsiumchlorid	18
2.1.4	Quantifizierung der Viruskonzentration durch quantitative Echtzeit-PCR.....	18
2.1.5	Tet-Off-System.....	19
2.2	Tiermodell	19
2.2.1	Überblick.....	20
2.2.2	Anästhesie	21
2.2.3	Induktion der Ischämie.....	21
2.2.4	Therapie.....	23
2.2.5	Mikrosphären-Messung.....	23
2.2.6	Angiographie	24
2.2.7	Versuchsende	25
2.3	Kollateralenwachstum	25
2.4	Blutflussgeschwindigkeit.....	26
2.5	Blutflussmessung durch Mikrosphären	26
2.6	Histologie.....	28
2.6.1	Kapillarwachstum.....	28
2.6.2	Alkalische Phosphatase-Färbung	28
2.6.3	Pecam-NG2-Färbung	29
2.6.4	β -Galaktosidase-Färbung	31
2.7	Quantitative Echtzeit-PCR	31
3	Ergebnisse	34
3.1	Translation der AAVs.....	34
3.1.1	β -Galaktosidase-Färbung	34
3.1.2	Quantitative Echtzeit-PCR	34
3.2	Funktioneller Effekt von intermittierender T β 4-Expression	36
3.2.1	Kapillarwachstum.....	36

3.2.2	Kapillarreifung	37
3.2.3	Kollateralenwachstum	38
3.2.4	Analyse der Blutflussgeschwindigkeit	40
3.2.5	Analyse der Perfusion	40
3.3	Funktioneller Effekt von T β 4 mit Ang2	41
3.3.1	Kapillarwachstum.....	42
3.3.2	Kapillarreifung	43
3.3.3	Kollateralenwachstum	44
3.3.4	Analyse der Blutflussgeschwindigkeit	45
3.3.5	Analyse der Perfusion	46
3.4	Funktioneller Effekt von L-NAME	46
3.4.1	Kapillarwachstum.....	46
3.4.2	Kapillarreifung	47
3.4.3	Kollateralenwachstum	49
3.4.4	Analyse der Blutflussgeschwindigkeit	49
3.4.5	Analyse der Perfusion	50
4	Diskussion	51
4.1	Rekombinante Adeno-assoziierte Viren als effiziente und sichere Vektoren	51
4.2	Das Tet-Off-System als kontrollierter Gen-Regulator	52
4.3	Das Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie	53
4.4	Intermittierende Thymosin- β 4-Expression.....	55
4.5	T β 4 + Ang2.....	56
4.6	T β 4+L-Name:	59
5	Zusammenfassung.....	62
6	Abkürzungsverzeichnis.....	64
7	Literaturverzeichnis	67
8	Danksagung.....	81

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Die periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) entsteht in ca. 95% der Fälle aufgrund stenosierender und okkludierender Wandveränderungen der Aorta und Extremitätenarterien¹ auf dem Boden einer Atherosklerose². Diese verursachen eine Minderperfusion der betroffenen Extremität, welche klinisch als Claudicatio intermittens apparent wird. Meistens sind die unteren Extremitäten betroffen³. Die pAVK wird im deutschen Sprachraum nach der Fontaine-Klassifikation und im englischen Sprachraum nach Rutherford bewertet:

Fontaine		Rutherford		
Stadium	Klinische Symptome	Grad	Stadium	Klinische Symptome
I	Asymptomatisch	0	0	Asymptomatisch
IIa	Gehstrecke > 200m	I	1	Milde Claudicatio intermittens
IIb	Gehstrecke < 200m	I	2	Mäßige Claudicatio intermittens
		I	3	Schwere Claudicatio intermittens
III	Ischämischer Ruheschmerz	II	4	Ischämischer Ruheschmerz
IV	Nekrose, Gangrän	III	5	Kleinflächige Nekrose
		III	6	Großflächige Nekrose, Gangrän

Tabelle 1: Stadium II nach Fontaine wird als stabile Ischämie bezeichnet, Stadium III und IV gelten als kritische Ischämie (gemäß den Leitlinien zur pAVK, 2015)

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland leben schätzungsweise 2 Mio. Menschen beziehungsweise 6% der Erwachsenen mit einer pAVK⁴. Bei Patienten über 70 Jahren steigt die Prävalenz auf bis zu 20%³. Besonders betroffen sind Diabetes Typ 1- und Typ 2-Patienten: 49% der Patienten, die sich zum ersten Mal ärztlich mit einem Diabetischen Fuß vorstellen, leiden an einer pAVK⁵. 25% der Patienten mit Claudicatio intermittens sterben innerhalb von 5 Jahren. Da häufig eine begleitende Atherosklerose der Koronar- und Zerebralgefäße besteht, ist die Todesursache in den meisten Fällen ein Myokardinfarkt oder ein Schlaganfall. Von Patienten mit einer kritischen Ischämie (vgl. Tabelle 1) sterben 25% schon im ersten Jahr, weniger als 50% von ihnen leben noch nach 5 Jahren¹. Bei 30% der Patienten mit kritischer Ischämie findet eine Beinamputation statt⁶.

1.1.2 Konventionelle Therapie

Die Verbesserung der Lebensqualität für die Betroffenen, eine Hemmung der Progression der pAVK sowie die Risikoreduzierung kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse stehen im Vordergrund aller Therapieansätze der pAVK⁷. Maßnahmen zur Risikoreduzierung vaskulärer Ereignisse wie z.B. Rauchentwöhnung, Antihypertensiva und Lipidsenker sind schon ab Stadium I nach Fontaine indiziert. In Stadium II liegt der Fokus auf der Verlängerung der maximalen und schmerzfreien Gehstrecke. Dies kann medikamentös erreicht werden. So konnte z.B. die Gehstrecke unter der Therapie mit dem Xanthin-Derivat Pentoxifyllin, welches über Phosphodiesterase-Hemmung gefäßdilatierend wirkt, um bis zu 30% und unter Therapie mit dem Phosphodiesterase-III-Hemmer Cilostazol sogar um bis zu 60%^{8,9} gesteigert werden. Bessere Ergebnisse werden jedoch durch betreutes Gehtraining erzielt^{1,10}. Invasive Methoden der Revaskularisierung sind bei kritischer Ischämie in Stadium III und IV indiziert, je nach Leidensdruck des Patienten aber schon in Stadium II denkbar. Dazu gehören interventionelle Verfahren wie die Katheter-Atherektomie oder die Perkutane transluminale Angioplastie, aber auch operative Verfahren wie etwa die Anlage eines Bypasses. Eine weitere Möglichkeit ist die primäre Amputation¹¹, besonders bei sogenannten „no option“-Patienten, für die eine interventionelle oder chirurgische Revaskularisierung aufgrund von verschiedenen perioperativen Risikofaktoren nicht infrage kommt; jedoch wird auch bei bis zu 12% der Patienten nach interventioneller Revaskularisierung eine sekundäre Amputation notwendig¹². Die geringe 5-Jahres-Überlebensrate von <50% bei Patienten mit kritischer Ischämie und die oft schlechte Lebensqualität dieser Patienten sind Anlass für die Suche nach neuen, schonenderen Methoden, um die Durchblutung der Extremitäten zu verbessern und eine Amputation zu vermeiden. Ein besonderes Interesse gilt in diesem Zusammenhang der therapeutischen Angiogenese und Arteriogenese in den betroffenen Extremitäten.

1.2 Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese

1.2.1 Vaskulogenese

Als Vaskulogenese bezeichnet man die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen während der embryonalen Entwicklung. Diese Vorläuferzellen bilden Blutinseln, welche sich zu einem wabenförmigen Kapillarbett weiterbilden. Hieraus entwickelt sich in einem weiteren Schritt ein rudimentäres Gefäßsystem¹³. Man nahm lange an, dass nach der vollständigen Bildung eines embryonalen Gefäßsystems weitere Gefäße nur

durch Aussprossung schon vorhandener Endothelzellen entstehen können. Die Hypothese, dass auch im adulten Organismus Vaskulogenese durch frei zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPC's) stattfindet^{14,15}, ist derzeit sehr umstritten. Jedoch scheinen diese Zellpopulationen als Quelle für parakrine Faktoren zu dienen, welche Gefäßwachstum stimulieren können^{16,17}. Siehe Abb. 1 a).

1.2.2 Angiogenese

Angiogenese beschreibt die Entstehung neuer Gefäße aus schon bestehenden Gefäßen. Im gesunden Organismus befinden sich reife Gefäße in einem Ruhezustand, mit dichten Zellverbindungen in der Gefäßwand. Als Trigger der Angiogenese gilt die Gewebhypoxie¹⁸. Diese führt durch reaktive Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) zu einer Dilatation der Gefäßwand mit erhöhter Permeabilität und infolgedessen zu einem Durchsickern von Flüssigkeit in das umliegende Gewebe¹⁹. Einige der Endothelzellen bilden sich anschließend zu sogenannten „*Tip cells*“ mit Filopodien um und sprießen, einem VEGF-Gradienten folgend, in das umgebende Gewebe vor¹³. Die „*Tip cells*“ sprießen so lange, bis sie auf andere „*Tip cells*“ treffen oder die proangiogenetischen Signale (VEGF) nachlassen²⁰. Ihnen folgen die „*Stalk cells*“, andere Endothelzellen ohne Filopodien, die das Lumen bilden. Der Notch-Signalweg regelt durch laterale Inhibition der Endothelzellen die Differenzierung in „*Tip cells*“ und „*Stalk cells*“^{21,22}.

Sobald ein Lumen gebildet wurde, wird dieses durch ruhende Endothelzellen, sogenannte *Phalanx-Zellen*, stabilisiert²³. Durch Blutfluss wird das Gefäß geformt und durch Bildung einer Basalmembran sowie Rekrutierung von Perizyten gefestigt²⁰. Diese Form der Maturation ist unter anderem abhängig von *platelet-derived growth factor-B* (PDGF-B)^{24,25} und bei Erwachsenen zumindest teilweise abhängig von *LYL1*²⁶. Kommt es zu keiner Anlagerung von Perizyten, so bilden sich die noch unreifen Gefäße bei Ausbleiben des VEGF-A-Signales zurück²⁵.

Okkludierte Hauptgefäße können jedoch nicht allein durch Angiogenese ersetzt werden: Zum einen würden derart viele Kapillaren benötigt um das gleiche Volumen des zuvor verschlossenen Gefäßes zur Verfügung zu stellen, dass funktionell ein Hämangiom die Folge wäre¹⁸, zum anderen wirken Hauptgefäße durch die glatten Muskelzellen in der Gefäßwand tonusregulierend, eine Eigenschaft, die durch Angiogenese entstandene Kapillaren nicht haben. Siehe Abb. 1 b).

1.2.3 Arteriogenese

Arteriogenese ist definiert als Wachstum von Kollateralarterien. Herzog et al. konnten 2002 zeigen, dass Arteriogenese entgegen damaliger Vorstellungen nicht das Wachstum eines Gefäßes von der Kapillare bis zur Arterie ist, sondern vielmehr ein biphasischer Prozess, der aus einem raschen Größenwachstum prä-existenter Kollateralen und einem anschließenden, langsameren Umbau-Prozess der Zellwände, dem sogenannten *Remodeling*, besteht²⁷. Im Gegensatz zur Angiogenese ist Arteriogenese nicht Hypoxie-abhängig, sondern wird durch physikalische Kräfte getriggert²⁸: Dies geschieht zum Beispiel, wenn eine Hauptarterie verschlossen wird und sich das Blutvolumen auf umliegende Kollateralen verteilt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Kollateralen ihren Durchmesser durch *Remodeling* bis auf das 20-Fache ihrer ursprünglichen Größe steigern können²⁹: Durch den erhöhten Druckgradienten und die damit verbundene Schubspannung werden in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Lamina media vermehrt NO und später Monokine (MCP-1) und Monozyten-Bindungs-Moleküle (ICAM-1) ausgeschüttet¹⁹. Auf diese Weise rekrutierte Monozyten³⁰ und Lymphozyten³¹ infiltrieren die Gefäßwand und zersetzen die Lamina media mit Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Proteinasen. Sie sezernieren zudem gemeinsam mit Endothelzellen das für die Arteriogenese essentielle NO^{32,33}. Aktivierte Endothelzellen induzieren anschließend durch Überexpression verschiedener Faktoren die Größenzunahme des Gefäßes. Dies hat einen Abfall der Schubspannung an den Endothelzellen zur Folge, die wiederum vermehrt PDGF sezernieren¹⁸. Es kommt durch die erneute Anlagerung von glatten Muskelzellen vom elastischen und proliferativen Typ sowie Elastin und Kollagen, die das Gerüst für ein größere Gefäß bilden³³, zu einer deutlichen Zunahme der Intima³⁴. Da einige Kollateralen schneller wachsen, sinkt in den anderen Kollateralen die Schubspannung, was dort zu einer überschießenden Intimaproliferation mit nachfolgendem Gefäßverschluss führt³⁵. Dies ermöglicht einen effizienteren Bluttransport durch wenige große Kollateralen.

Siehe Abb. 1 c).

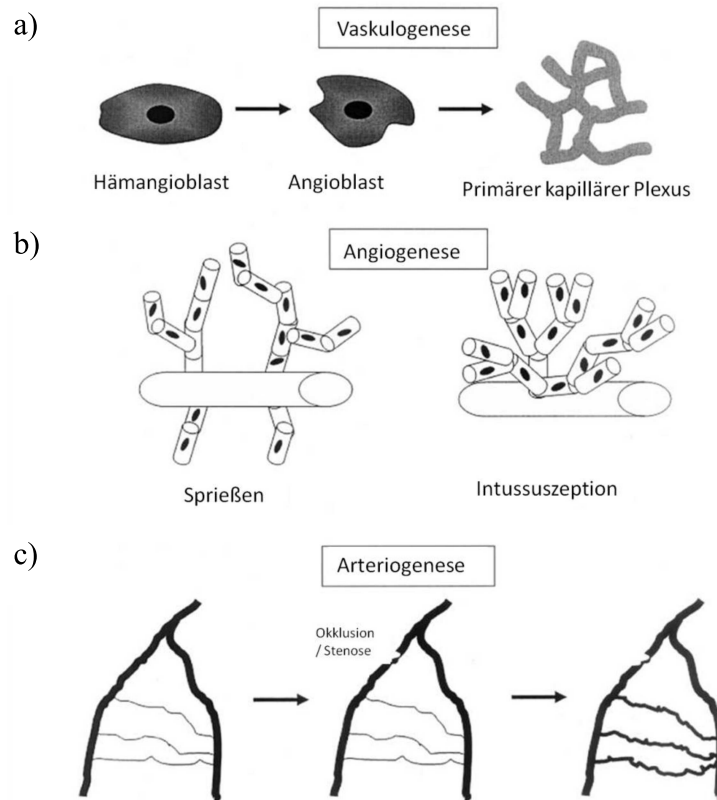


Abb. 1: Unterschiede zwischen Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese [nach Heil, Schaper, 2007].

1.3 Neue Therapieansätze

1.3.1 Allgemein

Schon seit Jahren werden verschiedene Strategien erforscht, um bei Patienten, bei denen eine konventionelle Therapie nicht erfolgreich war oder nicht infrage kommt, eine Revaskularisierung durch therapeutische Angiogenese und Arteriogenese zu erreichen.

1.3.2 Wachstumsfaktoren

Die ersten Bemühungen zielten auf eine gesteigerte Angiogenese durch lokale Applikation von Wachstumsfaktoren. So wurden mit VEGF^{36,37}, FGF-2³⁸, MCP-1²⁹ und GM-CSF³⁹ vielversprechende Ergebnisse im ischämischen Myokard- und Hinterlaufmodell von Schweinen und Kaninchen erzielt. In klinischen Studien konnte jedoch ein therapeutischer Nutzen weder für FGF-2⁴⁰, VEGF⁴¹ noch GM-CSF⁴² nachgewiesen werden. Ein weiterer Ansatz ist die Applikation endothelialer und mesenchymaler Progenitorzellen (EPC und MPC) in ischämische Areale^{43,44}. Unter Zuhilfenahme des Fusionsproteins S1FG zur gezielten Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen konnten die Ergebnisse nochmals verbessert werden⁴⁵. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Wirkung embryonaler EPC

Thymosin- β 4-abhängig ist⁴⁶. Die positiven Ergebnisse aus präklinischen Studien ließen sich jedoch nicht in demselben Maße auf Menschen übertragen, so dass man inzwischen den Weg der reinen Wachstumsfaktor-Applikation zugunsten von Gentherapien aufgegeben hat.

1.3.3 Gentherapie

Als Gentherapie gilt das Einsetzen von DNA in Körperzellen eines Individuums mit dem Zweck, eine Krankheit zu behandeln. Es gibt zwei Arten der Gentherapie: Die Keimbahn-Gentherapie, bei welcher das Gen in eine Keimzelle oder eine Embryonalzelle eines frühen Entwicklungsstadiums eingebracht wird und auch an nachfolgende Generationen weitervererbt wird, sowie die somatische Gentherapie, in welcher ein Gen in eine differenzierte Körperzelle eingeschleust wird und nur dort (entweder als Bestandteil des Genoms oder als Episom) wirkt. In dieser Arbeit soll nur auf die somatische Gentherapie eingegangen werden.

Damit die Zielzelle die therapeutisch eingeschleuste DNA exprimieren kann, muss die DNA zuerst in deren Zellkern gelangen. Das Transportmedium für die DNA wird als Vektor bezeichnet. Es gibt zwei Arten von Vektoren: virale und nicht-virale.

Nicht-virale Transfektion bedient sich eines Plasmids, einer ringförmigen, beliebig großen, nichtverpackten und nicht-pathogenen DNA-Struktur, die mechanisch in die Zielzelle eingebracht wird. Bei relativ guter Transfektionsrate durch DNA-Transporter wie Liposomen⁴⁷, Nanosphären⁴⁸ und Gelatine⁴⁹ hat diese Methode jedoch besonders in vivo nur eine kurze Expressionsdauer und muss daher regelmäßig wiederholt werden, um einen dauerhaften Effekt zu erreichen⁵⁰. Dies ist an sich kein Problem, da Plasmide keine Immunantwort hervorrufen, doch ist die Transfektionseffizienz nicht vergleichbar mit viralen Vektoren⁵¹. Siehe Tabelle 2.

Virale Vektoren zeichnen sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus, unterscheiden sich aber noch in weiteren Qualitäten untereinander: Adenoviren haben eine schnelle Expression innerhalb von wenigen Tagen, bilden im Zellkern ein Episom und integrieren sich nicht in die DNA der Zielzelle, was dem Risiko einer kanzerogenen Entartung entgegenwirkt. Sie rufen jedoch eine Immunantwort hervor, die sowohl die Expressionsdauer begrenzt⁵² als auch den erneuten therapeutischen Einsatz erschwert⁵³. Die viralen Replikationsgene wurden von der ersten bis zur dritten Generation immer weiter reduziert, was weniger virale Proteine und eine reduzierte T-Zell-Immunantwort zur Folge hatte⁵⁴. Dennoch ist ihre Expressionsdauer sehr

begrenzt. Lentiviren sind nach anfänglicher Begeisterung über ihre Fähigkeiten in der Therapie des *severe-combined-immunodeficiency-syndrome* (SCID-Syndrom) von Kindern umstritten wegen möglicher Vektor-induzierter Leukämien⁵⁵. Aufgrund ihrer Tendenz, sich an zufälligen Stellen in die DNA der Wirtszelle einzufügen, gibt es berechtigte Sorgen, dass dies zu malignen Entartungen führen kann. Doch wurden neue Generationen von Lentiviren entwickelt, in denen diese Tendenz weniger stark ausgeprägt ist⁵⁶. Zu Adeno-assoziierten Viren (AAVs) siehe Kapitel 1.4.

Zusätzlich zu vorhandenen Tropismen der viralen Vektoren kann die Expression der Gene durch gewebespezifische Promoter noch besser auf das Zielgewebe begrenzt werden⁵⁷.

	Nackte DNA	Adenovirus (Generation)			AAV	Lentivirus
		1	2	3		
Genom	cDNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA	ssDNA	ssDNA
Größe	~10 kb	~7,5 kb	~10 kb	~35 kb	~4,5 kb	~8 kb
Integration	nein	nein	nein	nein	Wildtyp: ja Rekombinant: nein	zufällig
Transduktions-effizienz	niedrig	hoch	hoch	hoch	hoch	hoch
Immunantwort	niedrig	hoch	mittelhoch	moderat	niedrig	niedrig
Expressionsmuster	kurzzeitig	kurzzeitig	kurzzeitig	kurzzeitig	lang	lang

Tabelle 2: Vor- und Nachteile verschiedener Vektorsysteme [nach Hinkel et al., 2011] ds: Doppelstrang, ss: Einzelstrang

Zunächst wurden in der kardiovaskulären Forschung nackte VEGF-exprimierende Plasmide verwendet^{58,59}, erst später arbeitete man mit viralen Vektoren wie Adenoviren^{60,61}, Lentiviren und AAVs in Kombination mit verschiedenen Wachstumsfaktoren. Angesichts der ungenügenden klinischen Erfolge der bisher erforschten Wachstumsfaktoren ist ein weiteres Ziel aktueller Forschung die Identifikation geeigneter Proteine, welche vektorvermittelt transfiziert und überexprimiert werden. Als solches gilt unter anderem Thymosin-β4 (TB4), ein Wachstums- und Schutzfaktor mit pleiotropem Effekt⁴⁶.

1.4 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

AAVs gehören zur Familie der einzelsträngigen, nicht-pathogenen Parvoviren⁶². Sie sind sehr klein (~25nm) und können bis zu 5 Kilobasen DNA aufnehmen. Da sie sich nicht ohne Hilfe von Helferviren wie Adenoviren, humanen Papillomaviren oder Herpesviren replizieren können, werden sie zu den Dependoviren gezählt^{63,64}. AAVs werden in Serotypen 1 – 11 oder

auch entsprechend ihres phylogenetischen Erscheinens in Hauptgruppen eingeteilt⁶⁵. Die Serotypen zeigen unterschiedliche Tropismen, Transduktionseffizienzen, Expressionsraten und auch Eliminationsgeschwindigkeiten aus dem Blut. So hat Serotyp 2 z.B. eine geringe Transduktionseffizienz, zeigt aber in vielen Geweben die höchste transgene Expressionsrate; Serotyp 9 hat einen Tropismus zu Myozyten und Kardiomyozyten und zeigt dort von allen Serotypen die stärkste Gewebeexpression und die höchsten Proteinspiegel^{52,62}. Die Effizienz von AAV-2 kann dadurch gesteigert werden, dass das AAV-2-Genom in das Kapsid eines anderen Serotypen (z.B. Typ 9) verpackt wird und so eine bessere Transduktion (im Falle von Serotyp 9 speziell in Myozyten und Kardiomyozyten) erreicht wird^{66,67}. Es hat sich herausgestellt, dass durch intramuskuläre Injektion der AAVs anstelle einer intravenösen Gabe sowohl die benötigte Menge der AAV drastisch reduziert als auch ihre Expression auf ca. 5 mm um den Injektionsort herum begrenzt werden kann⁶⁸. AAVs haben eine hohe Transfektionsrate bei einer im Vergleich zu Adenoviren späteren Expression ihrer Gene. Wenn jedoch das endgültige Expressionsniveau erreicht wird, kann dies bei nur sehr geringer immunologischer Reaktion über Monate beibehalten werden⁵².

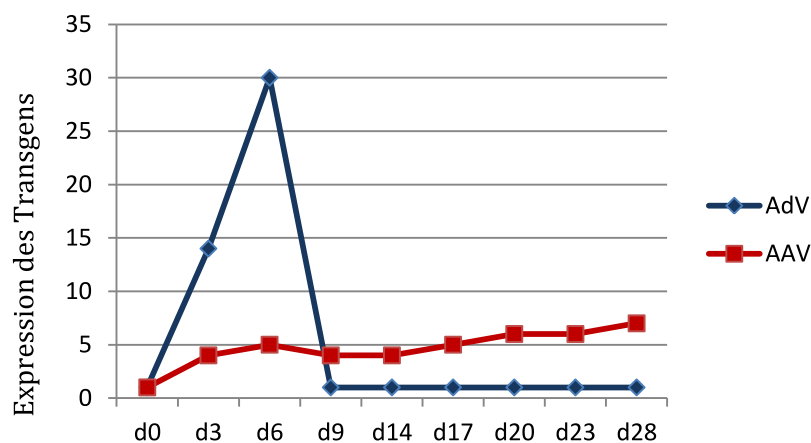


Abb. 2: Bei Adenoviren ist die Expression schnell und stark, jedoch zeitlich sehr begrenzt, bei AAVs steigt sie langsam an, bleibt aber lange Zeit konstant [nach Gruchala et al., 2004].

Das AAV wird von der Zielzelle endozytiert, im Zytosol freigelegt und seine DNA in den Zellkern aufgenommen. Die DNA des Wildtyp-AAV integriert sich in das menschliche Genom, in den meisten Fällen an einer AAVS1 genannten Stelle auf Chromosom 19 (Chr 19q13.3)⁶⁹. Den in der Gentherapie verwendeten rekombinanten AAVs (rAAV) fehlen sowohl die „*inverted terminal repeat*“ genannten Endstücke als auch das Replikationsprotein „*rep*“, was eine gezielte Integration in das menschliche Genom unmöglich macht. Die DNA von rAAVs bildet im Zellkern ein Episom und wird dort komplementiert und translatiert⁷⁰,

jedoch kam es auch bei rAAVs zu ungezielter Integration in das Genom mit nachfolgender Deletion und chromosomaler Neuordnung⁷¹.

Bisher sind keine immunpathogenen Einflüsse von AAVs bekannt, weshalb sie sich gut zur Gentherapie am Menschen eignen⁵¹. Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass AAVs auch langfristig nicht das Risiko für ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) erhöhen⁷² und somit auch für einen längeren klinischen Einsatz vermutlich sicher sind. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass mittels AAV intramuskulär transfizierte Gene u.a. von VEGF-A und Thymosin-β4 nur im nahen Applikationsbereich überexprimiert werden und nicht in anderen Teilen des Körpers^{68,73,74}.

1.4.1 Das Tet-Off- und Tet-On-System

Die Arbeitsgruppe um Gossen und Bujard beschrieb 1992 die gezielte Beeinflussung von Genexpression durch das Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator-Protein (tTa)⁷⁵, welches DNA an spezifischen *Tet-Operator* (TetO)-Sequenzen binden kann. In der Regel werden mehrere TetO-Sequenzen vor einem Promotor platziert, um diesen und das nachgeschaltete Gen kontrollieren zu können. Werden nun bei einem Tet-Off-System Tetrazykline, insbesondere das stabile Doxycyclin, verabreicht, so binden diese das tTa-Protein und verhindern, dass dieses die TetO-Sequenzen und die nachgeschalteten Gene aktivieren kann. Diese Blockade ist reversibel und kann durch Doxycyclingabe gezielt gesteuert werden.

In einem Tet-On-System kann das tTa-Protein die TetO-Sequenzen nur binden und aktivieren, wenn es zuvor von einem Tetrazyklin, z.B. Doxycyclin gebunden wurde. Auch dieses System ist reversibel und kann gezielt beeinflusst werden.

1.5 Thymosin-β4 (Tβ4)

1.5.1 Allgemein

Thymosin, welches aus verschiedenen Polypeptiden zwischen 1 und 15 kDa zusammengesetzt ist, wurde erstmals 1965 von der Arbeitsgruppe um A. White aus bovinem Thymusgewebe isoliert⁷⁶. Das Peptid Thymosin-β4 wurde erst 7 Jahre später aus Thymosin isoliert und beschrieben⁷⁷. Thymosin-β4 ist ein wasserlösliches, 4965Da großes Peptid, welches, mit Ausnahme der Erythrozyten, ubiquitär in Wirbeltieren vorhanden ist. Es gibt noch viele weitere Thymosine, die nach ihrem isoelektrischen Punkt eingeteilt werden in α-Thymosine mit einem pH-Wert < 5,0, β-Thymosine mit einem pH-Wert zwischen 5,0 und 7,5

und γ -Thymosine mit einem pH-Wert $> 7,5$. Sie alle wurden der Chronologie ihrer Entdeckung folgend nummeriert. In den meisten Geweben von Säugetieren existieren zwei β -Thymosine, wobei T β 4 mit ca. 80% den deutlich höheren Anteil hat⁷⁸.

1.5.2 Die Funktion von Thymosin- β 4 im Zytosol

T β 4 bindet an intrazelluläres, monomeres G-Aktin, wobei insbesondere die ersten 7 der 43 vorhandenen Aminosäuren für die Inhibition der Polymerisation von Aktin wichtig und die Aminosäuren 13 – 23 für die Bindung an G-Aktin unverzichtbar sind⁷⁸. Alleine das Austauschen der ersten Aminosäure am N-Terminus von Serin zu Alanin (kaninchenspezifisches T β 4^{Ala}) hat eine 3-5-fach erhöhte Affinität zu G-Aktin zur Folge⁷⁹, wobei das exklusive Vorkommen noch nicht erklärt ist. T β 4 ist durch Sequestrierung von G-Aktin an der intrazellulären Signalkaskade beteiligt: Indem es freies G-Aktin mit der Aktinbindedomäne bindet, wird eine Polymerisation zu filamentösem F-Aktin verhindert⁸⁰. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* unter ionischen Bedingungen über 90% des freien G-Aktins unverzüglich zu F-Aktin polymerisieren würden⁸¹, so dass diese Sequesterfunktion des T β 4 wichtig für das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin ist und auch die schnelle Reaktionsfähigkeit der Zelle gewährleistet, indem das gebundene G-Aktin bei Bedarf rasch zur Polymerisation freigegeben wird⁸²⁻⁸⁴. Ferner kann T β 4 F-Aktin depolymerisieren. So konnte gezeigt werden, dass Aktin aus dem Sputum von Patienten mit Zystischer Fibrose von T β 4 dosisabhängig und zeitabhängig depolymerisiert wurde⁸⁵. T β 4 reguliert darüber hinaus die Aktivität des „*Myocardin-related-transcription-factor*“ (MRTF): MRTF-A und MRTF-B konkurrieren im Zytosol mit T β 4 um freies G-Aktin. Steigt der MRTF-Spiegel im Zytosol an, zum Beispiel weil es von T β 4 aus der Bindung zu G-Aktin verdrängt wurde, so gelangt MRTF in den Zellkern und aktiviert dort den „*Serum-response-factor*“ (SRF)⁸⁶. Dies hat eine ganze Reihe von Auswirkungen über Neuordnung des Zytoskelettes⁸⁷, Zellbeweglichkeit⁸⁸, Muskelwachstum und Regeneration⁸⁹ bis hin zu Angiogenese und Maturation von kleinen Gefäßen⁷³ (siehe auch Kapitel 1.5.4).

1.5.3 Thymosin- β 4 und Antiinflammation

Der modulierende Effekt von T β 4 auf inflammatorische Reaktionen konnte in zahlreichen experimentellen Studien nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass T β 4-Spiegel in Thrombozyten und polymorphonukleären neutrophilen Leukozyten (PMN) am höchsten sind; beide Zelltypen gehören zu den ersten, die in frische Wunden einwandern und dort ihre Wirkstoffe verbreiten⁹⁰. Bei Hautwunden wird die Reepithelisierung und der Wundverschluss durch T β 4 beschleunigt, zudem wird eine gesteigerte Einwanderung von Keratinozyten in das

Wundareal bewirkt⁹¹. In einem kornealen Wundheilungsassay konnte nach lokaler Applikation von Tβ4 neben der beschleunigten Reepithelisierung ein modulierender Effekt auf Zytokine, darunter Interleukin 1β (IL-1β) und Interleukin 18 (IL-18) nachgewiesen werden⁹². Nach schwerwiegenderer Augenverletzung durch induzierten Alkalischaden bewirkte Tβ4 eine Reduktion an IL-1β und von *chemokine macrophage inflammatory protein* (MIP)-1α, -1β, 2 und *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1⁹³. An humanen kornealen Epithelzellen, welche mit TNF-α stimuliert wurden, konnte durch Tβ4 der NFκB-Proteinspiegel, die NFκB-Aktivität und die Phosphorylierung der Untereinheit p65 signifikant herunterreguliert werden⁹⁴. Es konnte gezeigt werden, dass diese Wirkweise Aktin-unabhängig funktioniert⁹⁵. Bei Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Sepsismodellen wie auch bei Sepsispatienten waren Tβ4-Spiegel deutlich erniedrigt; durch exogene Tβ4-Gabe konnte im murinen Sepsismodell die Mortalitätsrate gesenkt werden, zudem sanken die Blutspiegel von Zytokinen, Eikosanoiden und anderen inflammatorischen Molekülen⁹⁶. Es ist bekannt, dass G-Aktin bei Entzündungsreaktionen und Apoptose freigesetzt wird, welches dann zu F-Aktin polymerisiert und die Entzündungsreaktion fördert⁹⁷. Der positive Einfluss auf Sepsispatienten kann durch die G-Aktin-sequestrierende Wirkung von Tβ4 erklärt werden; hierdurch wird der entzündungsfördernde Effekt von Aktin begrenzt und der Toxizität entgegengewirkt⁹⁶. Auch im Herzinfarktmodell konnte ein kardioprotektiver Effekt bei lokaler EPC-Anwendung zumindest teilweise auf Tβ4 zurückgeführt werden⁹⁸.

1.5.4 Thymosin-β4 in Angiogenese und Arteriogenese

Tβ4 stimuliert auf verschiedene Arten die Angiogenese, dieses Feld ist auch derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung. Die ersten Hinweise auf eine proangiogenetische Wirkung von Tβ4 wurden 1995 mit Matrigel-Assays erzielt⁹⁹. Einige Jahre später wurde die Wirkung von exogenem Tβ4 auf Endothelzellen in einem koronaren Angiogen-essay beschrieben: Dieses führt zu vermehrter „*tube formation*“ und gesteigerter vaskulärer Aussprossung, so dass man nun Tβ4 eine autokrine und eine parakrine Wirkweise in der Angiogenese zuordnen konnte¹⁰⁰. Im Jahr 2003 wurde nachgewiesen dass die sieben Aminosäuren umfassende Aktinbindungsdomäne des Tβ4 essentiell für die angiogene Wirkung ist¹⁰¹, doch weitere Studien erhärten die Vermutung, dass auch andere Aktin-unabhängige Wirkweisen eine Rolle spielen¹⁰². So konnte gezeigt werden, dass Tβ4 indirekt über Stabilisierung des Proteins HIF-1α die Expression von VEGF, einem starken proangiogenetischen Faktor, induziert¹⁰³. Die Arbeitsgruppe um Paul Riley konnte 2006 zeigen, dass Tβ4 durch Stimulation von Endothelzellen an Angiogenese und durch Attraktion von glatten Muskelzellen an Maturation und Arteriogenese beteiligt ist. In diesem Zusammenhang ist es für die embryonale

Entwicklung von murinen Koronargefäßen von essentieller Bedeutung; ein angeborener Mangel an Tβ4 führt schon in der Embryonalzeit zu schweren Herzfehlern und zum Tod¹⁰⁴. Es ist bekannt, dass EPCs Angiogenese induzieren, sowohl in vitro als auch in vivo, z.B. im ischämischen Hinterlaufmodell^{16,105}. Tβ4 stimuliert die EPC-Migration über den PI3K/Akt/eNOS-Signalweg¹⁰⁶. Schließlich wurde anhand von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) gezeigt, dass durch Tβ4 vermehrt Notch1 und Notch4 exprimiert werden und somit die angiogene Wirkung auch über den Notch-Signalweg vermittelt wird¹⁰⁷. Der Einfluss von Tβ4 auf die Maturation von Gefäßen durch Synergie mit dem „*transforming growth factor-beta*“ (TGF-β)-Signalweg wurde durch die Arbeitsgruppe um Paul Riley aufgezeigt¹⁰⁸. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben einen Tβ4-MRTF-SRF-CCN-Signalweg aufgezeigt: Tβ4 setzt im Zytosol durch Bindung an G-Aktin MRTF frei, dieses wandert anschließend in den Zellkern und aktiviert dort SRF. Daraufhin werden CCN1 und CCN2 exprimiert⁷³, zwei Gene die über Angiogenese und Perizyten-Anlagerung an der Entstehung von kleinen Gefäßen beteiligt sind^{109,110}.

1.6 Das Angiopoietin/Tie-Rezeptor-System

1.6.1 Allgemein

Das Angiopoietin/Tie2-Rezeptor-System spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Endothelzellen^{111,112}. Die Familie der Angiopoietine umfasst Angiopoietin-1 (Ang1) bis Angiopoietin-4, wobei Ang1 und Ang2 bisher am besten untersucht sind. Ang1 und Ang2 sind partiell-antagonistische Liganden, welche an die extrazelluläre Domäne des Tie2-Rezeptors binden, einer Tyrosinkinase, die fast nur von Endothelzellen exprimiert wird^{113,114}. Ang1 induziert die Autophosphorylierung von Tie2; die dadurch aktivierte PI 3-Kinase bewirkt die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt. Akt kontrolliert das ruhende Endothel und fördert Endothelzell-Überleben. Durch Phosphorylierung wird FKHR-1 inaktiviert und dadurch die Ang2-Expression blockiert. Phosphoryliertes Tie2 reagiert auch mit ABIN-2 und blockiert die NFκB-Aktivität. So werden inflammatorische Moleküle unterdrückt. Die Folge sind stabilisierte Gefäßwände, ruhendes Endothel und verbessertes Endothelzell-Überleben. Ang2 wirkt partiell antagonistisch am Tie2-Rezeptor und bewirkt eine Aktivierung der Endothelzellen und Destabilisierung der Gefäßwände¹¹⁵ (Siehe Abb. 3).

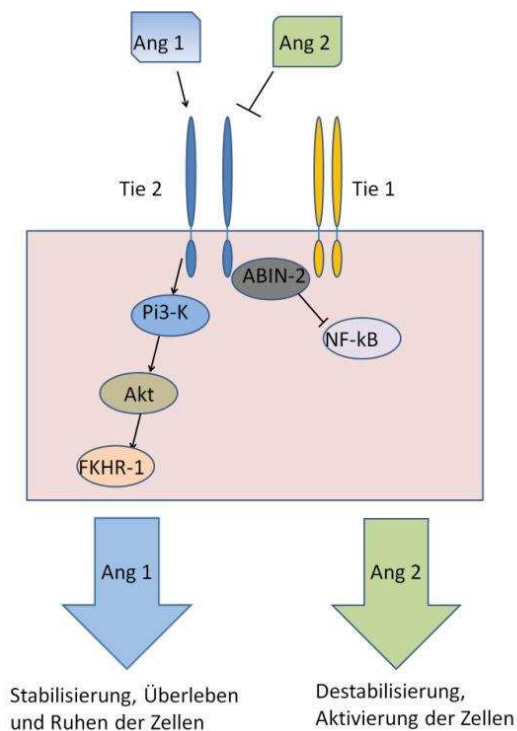


Abb. 3: Ang1 und Ang2 binden am Tie2-Rezeptor.

Ang1 bewirkt über Autophosphorylierung von Tie2 Gefäßwandstabilisierung, ruhendes Endothel und verbessertes Endothelzell-Überleben. Ang2 wirkt antagonistisch am Tie2-Rezeptor und bewirkt eine Aktivierung der Endothelzellen und Destabilisierung der Gefäßwände. [Nach Fiedler und Augustin, 2007]

1.6.2 Angiopoietin 1

Ang1 wird neben glatten Muskelzellen und Fibroblasten auch von Perizyten gebildet und sezerniert^{111,116} und wirkt sowohl am Tie2- als auch indirekt am Tie1-Rezeptor, wobei die Rolle von Tie1 in diesem Zusammenhang noch nicht abschließend geklärt ist; man vermutet jedoch eine rein inflammatorische Funktion^{117,118}. Ang1 bewirkt eine Gefäßreifung und Stabilisierung der Endothelzellen¹¹⁹. Zudem verhindert es in verschiedenen in-vivo-Modellen eine gesteigerte, durch VEGF und andere Entzündungsmediatoren induzierte vaskuläre Permeabilität¹²⁰. Auch bei akutem Stress auf die Endothelzellen stabilisiert es die Gefäßwand, indem es eine Endothelreaktion und damit eine Ang2-Freisetzung unterdrückt¹²¹. Die Stabilisierung der vaskulären Permeabilität wird erreicht, indem Ang1 verschiedene Schlüsselfunktionen der endothelialen Barrierefunktion moduliert: Zum einen reguliert es die Konzentration von Haftungsproteinen, in erster Linie vascular endothelial (VE)-cadherin an den zwischenendothelialen Junctionen, indem es die VEGF-induzierte VE-cadherin-Endozytose blockiert¹²², zum anderen stabilisiert es das kortikale Aktin-Zytoskelett durch Aktivierung von Rac1, welches wiederum die Endothelzellstabilität fördert¹²³. Weitere Mechanismen beinhalten Protein-Kinase C (PKC), endotheliale-NO-Synthase (eNOS) und β -Catenin sowie PDGF-B¹²⁴⁻¹²⁶. Ang1 wirkt darüber hinaus antiapoptotisch und antiinflammatorisch¹²⁷, u.a. indem es durch den Akt- und ABIN-2-Signalweg die NF κ B-Aktivität unterdrückt¹²⁸. Siehe auch Abb. 3.

1.6.3 Angiopoietin 2

Ang2 wird in Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert. Es ist in ruhendem Endothel im Zytosol kaum nachzuweisen¹²⁹, wird aber bei Triggern wie Entzündung, Hypoxie, VEGF, FGF-2 und TNF schnell freigesetzt^{130,131}. Seine autokrine Wirkweise an Endothelzellen¹³² ist antagonistisch zu Ang1, indem es an der gleichen Stelle von Tie2 bindet und dessen Phosphorylierung verhindert. Es wirkt am Tie2-Rezeptor schwächer als Ang1¹¹², was der jeweiligen Funktion entgegenkommt: Ang1 bewirkt als Dauerstimulans an Tie2 eine dichte Gefäßwand mit ruhenden Endothelzellen; Ang2 wirkt als dynamischer Gegenspieler, der bei Stressreizen in hohen Spiegeln vorhanden ist. Bei Ausschüttung von Ang2 kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand, zum einen durch Destabilisierung der Endothelzell-Verbindungen und Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran, zum anderen durch ein Loslösen der Perizyten¹³³⁻¹³⁵. Die Wirkung von Ang2 ist umgebungsabhängig: In Gegenwart von VEGF wirkt es proangiogenetisch, z.B. sind Ang2-Spiegel in den *Tip Cells* neu sprießender Gefäße stark erhöht¹³⁶, in Abwesenheit von VEGF führt es dagegen zu einer Rückbildung der Gefäße^{119,137}. Ang2 wirkt selbst proinflammatorisch, so entwickelten Ang2-defiziente Mäuse mit Peritonitis keine entzündliche Antwortreaktion, am ehesten durch einen Verlust der TNF- α -Sensitivität der Endothelzellen bedingt¹³⁸. In Ang2-transgenen Mäusen war bei Hinterlaufischämie die Revaskularisierung und Perfusion deutlich eingeschränkt, u.a. durch reduzierte Kollateralenbildung und geringere Anlagerung von glatten Muskelzellen an die Gefäßwände¹³⁹. Die eigene Arbeitsgruppe konnte an einem murinen Hinterlaufischämie-Modell zeigen, dass bei kontinuierlicher Ang1- und auf die Tage nach Ischämie begrenzter Ang2-Überexpression die Durchblutung deutlich zunahm, gekoppelt mit einer vermehrten Kapillardichte und Gefäßreifung, ein Ergebnis, das weder durch Ang1 noch Ang2 alleine erzielt werden konnte¹⁴⁰.

1.7 Stickstoffmonoxid (NO) und Arteriogenese

Endothelzellen produzieren über die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin¹⁴¹, wenn sie durch angiogene Faktoren wie VEGF, TGF- β oder *basic fibroblast growth factor* (bFGF) stimuliert werden¹⁴²⁻¹⁴⁵. Es gibt drei verschiedene NO-Synthasen: Die endothelspezifische *eNOS*, die Makrophagen-spezifische *iNOS* und die neuronenspezifische *nNOS*. NO wirkt an Blutgefäßen

durch eine Erhöhung des Cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels antagonisierend auf vasokonstriktorische Faktoren, allen voran das sympathische Nervensystem, und bewirkt somit eine Vasodilatation¹⁴⁶. Die Forschungsgruppe um Matsunaga konnte im Jahr 2000 durch Inhibitionsversuche nachweisen, dass der *NOS-pathway* unter Beteiligung von NO ein essentieller Bestandteil der Angiogenese und Arteriogenese ist^{147,148}. Ebong et al. konnten kürzlich zeigen, dass durch Schubspannung induzierte eNOS-Phosphorylierung in zentraler Weise von *Glypican-1* (GPC1) reguliert wird, einem Kernprotein von Heparansulfat, welches als Bestandteil der endothelialen Zellwand wiederum für die NO-Freisetzung essentiell ist¹⁴⁹. Bis heute ist nicht im Detail verstanden, über welche molekularen Mechanismen NO auf Arteriogenese wirkt, jedoch ist ein Einfluss auf Wachstumsfaktoren wie VEGF nachgewiesen^{148,150}.

1.8 Fragestellung der vorliegenden Studie:

- Wirkt eine sequentielle Tß4-Überexpression ähnlich effizient auf Angiogenese und Arteriogenese wie eine kontinuierliche Überexpression.
- Welchen funktionellen Effekt hat die Koapplikation von Tß4 und Angiopoietin-2 auf Angiogenese und Arteriogenese.
- Welchen funktionellen Effekt hat die anfängliche Applikation von Ang2, gefolgt von einer Thymosin-ß4-Therapie auf Angiogenese und Arteriogenese.
- Ist das Kollateralenwachstum von der NO-Rückkopplung des Endstromgebietes abhängig.

2 Material und Methoden

2.1 Produktion rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren

Um rekombinante AAV-Vektoren zu produzieren, die ein gewünschtes Zielprotein codieren, bedient man sich der Tripeltransfektionsmethode. Dabei werden drei Plasmide in einer Zelle zusammengeführt:

1. Ein Plasmid mit den relevanten Informationen des Helfervirus
2. Ein Plasmid mit den benötigten AAV-Strukturen
3. Ein Plasmid mit dem Zielgen inklusive Promotor

2.1.1 Vorbereitung der Zellen für die Transfektion

Zuerst wurden HEK293-Zellen auf 50 Platten mit je 22,1 cm² gesplittet und dort bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Das Medium wurde zwei Stunden vor der Transfektion über einen Vakuumabzug mit einer 2 ml-Aspirationspipette abgesaugt und durch frisches serumfreies Medium ersetzt. Die Transfektion der Zellen erfolgte anschließend mit Polyethylenimin (PEI).

Das dazu benötigte Transfektionsgemisch wurde folgendermaßen hergestellt:

Für 50 Platten wurden 40 ml serumfreies Medium in ein Falcon-Tube gefüllt. Dazu wurden folgende Plasmide gegeben:

Transfektionsgemisch:

pA Δ F6, Adenovirus Helferplasmid, stellt die für die AAV-Herstellung benötigten adenoviralen Proteine zur Verfügung	1300 μ g
P 600 Transplasmid, enthält die notwendigen rep und cap Gene des AAV	650 μ g
Cisplasmid, stellt das Transgen und die ITR-Regionen	650 μ g

Das Gemisch wurde gevortext und in vier Falcon-Tubes zu je 10 ml aufgeteilt. In jedes Falcon-Tube wurden 15 ml serumfreies Medium pipettiert und anschließend gevortext. Anschließend wurden 1300 μ l PEI (1 μ g/ μ l) pro Ansatz dazugegeben und erneut gevortext, danach inkubierte das Gemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Bei der Transfektion wurden 2,1 ml des Transfektionsgemisches gleichmäßig über die Platten verteilt und diese dann vorsichtig geschwenkt. Vier Stunden nach Transfektion wurde das serumfreie Medium durch Beigabe von DMEM mit 50% FCS und 1% Pen/Strep substituiert.

2.1.2 Ernte und Aufreinigung der Viren

24 Stunden nach Transfektion wurde das Zellmedium gewechselt. Weitere 48 Stunden danach konnten die Viren geerntet werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in ein Falcon-Tube überführt. Dies wurde anschließend für 15 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet über Nacht bei -80°C eingefroren.

Die gefrorenen Zellen wurden bei der Aufreinigung der Viren zunächst für 10 Minuten bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde das Pellet in 27 ml TMN-Puffer suspendiert, auf ein Endvolumen von 35 ml eingestellt und auf Eis gekühlt. Danach folgte die Sonifizierung des Zelllysates für dreimal je 30 Sekunden bei „output“ 5 und 30% im Eiswasserbad. Um freie RNA und DNA abzubauen wurden 3 µl Benzonase (Endkonzentration: 25 U/ml) hinzugegeben und das Lysat vorsichtig geschwenkt und anschließend für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde das Lysat alle 5 Minuten umgedreht. Hiernach wurde zum Aufschluss der Zellen 1,25 ml 10% Desoxycholsäure hinzugegeben und das Lysat vorsichtig invertiert. Daraufhin inkubierte das Lysat 10 Minuten bei 37°C, gefolgt von 15 Minuten Lagerung auf Eis. Für die Reinigung wurde das Lysat anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues, steriles Falcon-Tube gefüllt. Die Aufreinigung der Viruspartikel gelang durch Ultrazentrifugation und Dichtebestimmung über einen Cäsiumchloridgradienten. Dazu wurden pro Milliliter Überstand 0,454 g Cäsiumchlorid (CsCl) beigegeben und vermischt, so dass das Endvolumen ca. 32 – 34 ml betrug. Zur Herstellung eines 2-Tier-Cäsiumchloridgradienten wurden je 9 ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,41 ρ und 1,61 ρ in zwei SW-28 Tubes gefüllt. Dabei wurde erst das weniger dichte Gemisch pipettiert und anschließend das dichtere darunter pipettiert. Danach wurden je 16 – 17 ml des Zelllysates hinzugegeben, dabei wurde darauf geachtet, dass der Gradient nicht zerstört wurde. Das Gemisch wurde nun mit 25.000 rpm bei 15°C über 18 – 20 Stunden ultrazentrifugiert. Hierdurch sanken die Viruspartikel nach unten, wobei der Gradient so beschaffen war, dass die Dichte der Viruspartikel ungefähr der durchschnittlichen Dichte des Gradienten entsprach. Nach der Zentrifugation wurde jeder Ansatz in 1 ml Fraktionen in Eppendorfgefäße gegeben.

Aus jedem Eppendorfgefäß wurden 5 µl entnommen und der Refraktionsindex mittels Refraktometer bestimmt. Fraktionen, welche einen AAV enthalten, weisen einen Refraktionsindex zwischen 1,362 – 1,373 auf. Außerhalb dieses Zielindex‘ gelegene Fraktionen wurden entsorgt. Im Zielbereich gelegene Fraktionen wurden vereinigt, in zwei

70-Ti-quick-seal-Röhrchen gegeben und bei Bedarf mit 1,41 ρ CsCl aufgefüllt. Die Röhrchen wurden anschließend mithilfe eines Heizstabes und einer Öse verschlossen und bei 60.000 rpm bei 15°C erneut für 20 – 24 Stunden ultrazentrifugiert.

Danach wurden die versiegelten Röhrchen mit einer 16G Nadel am oberen Ende angestochen, jeweils 1 ml abgezogen und auf zwei Eppendorfgefäße verteilt. Anschließend wurde das Röhrchen mit einem Skalpell geöffnet und vom restlichen Ansatz Fraktionen zu je 500 μ l auf Eppendorfgefäße verteilt. Davon wurde erneut der Refraktionsindex bestimmt und ebenfalls nur Fraktionen im Zielindex weiterverwendet. Wieder wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt und die Fraktionen danach nochmal in 500 μ l Ansätze verteilt. Nun wurde der Zielbereich des Refraktionsindexes auf 1,364 – 1,371 festgelegt. Fraktionen, die sich außerhalb dieses Zielbereichs befanden, wurden verworfen. Sich im Zielbereich befindende Fraktionen wurden gemeinsam in ein Falcon-Tube gegeben.

2.1.3 Lösung von Cäsiumchlorid

Um das Cäsiumchlorid zu entfernen, wurden Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units verwendet. Diese wurden zunächst mit PBS benetzt, anschließend wurden 4-5 ml PBS vorgelegt und das Virusgemisch in den Filter pipettiert. Das Endvolumen von ca. 12 ml wurde bei 3.000 rpm bei Raumtemperatur für 15 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Konzentrat von ca. 2 ml wurde mit 12 ml PBS gewaschen und durch erneute Zentrifugation auf 2 ml konzentriert.

2.1.4 Quantifizierung der Viruskonzentration durch quantitative Echtzeit-PCR

Der Virustiter wurde durch quantitative Echtzeit-PCR (rt-PCR) bestimmt. Dafür wurde der unbekannte Titer des rekombinanten AAV mit mehreren seriellen Verdünnungen eines Standards verglichen.

Für die Vorbereitung der rt-PCR wurden 10 μ l der Viruslösung abgenommen und ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu diente das DNase Amplification Grade Kit wovon 4 μ l DNase, 10 μ l DNase Puffer und 76 μ l H₂O zur Viruslösung hinzupipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden 2 μ l 25 mM EDTA hinzugegeben, um die DNase zu inaktivieren, gefolgt von 10 Minuten Inkubation bei 65°C. Danach wurde das Gemisch auf Eis gestellt.

Die Proben wurden gemeinsam mit dem TaqMan-Mix und einem Primer für das virusspezifische Bgh-Gen in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Von den AAV-Proben mit unbekanntem Virustiter wurden 2 Verdünnungen im Verhältnis 1:100 und 1:1000 verwendet.

Diese wurden mit einer Standardserie eines CMV-Vektor-Plasmids in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Standardserie bestand aus einer seriellen Verdünnung über 4 Stufen auf einer logarithmischen Skala zwischen 0,001 – 1 ng Plasmid. Nach Durchführung einer quantitativen rt-PCR wurde mit den PCR-Kurven des Standards eine Standardkurve erstellt. Anhand dieser konnte mithilfe der Zyklusnummer des untersuchten AAV dessen Virustiter abgelesen werden.

2.1.5 Tet-Off-System

In einigen Gruppen (Tß4-Tet, Tß4 + Ang2-Tet) wurde das Zielgen der AAV mit dem Tet-Off-System kombiniert. Dieses ermöglicht ein gezieltes Abschalten der Genexpression durch Tetrazyklin-Gabe (vgl. Kapitel 1.4.1).

Den Tieren wurde an Tag 0 entweder 5×10^{12} AAV Tß4-Tet injiziert oder gleichzeitig je 5×10^{12} AAV Tß4 und 5×10^{12} AAV Ang2-Tet. Die Abschaltung der Gene durch Doxycyclingabe p.o. erfolgte in der Tß4-Tet-Gruppe intermittierend ab Tag 9 für jeweils 5 Tage mit 2 Tagen Unterbrechung (keine Doxycyclingabe) und in der Tß4 + Ang2-tet-Gruppe kontinuierlich ab Tag 13.

2.2 Tiermodell

Das Tierversuchsprotokoll wurde entsprechend den Richtlinien der „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (US National Institutes of Health: NIH Publication No. 85-23, revised 1985) erstellt und vom bayerischen Tierschutz- und -gebrauchskomitee genehmigt (Tierversuchsnummer: 55.2-1-54-2531-106-10). Die Tierversuche fanden im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin statt.

In den Versuchen wurden weibliche Kaninchen der Rasse New Zealand White (Charles River GmbH) mit $2,5 \pm 0,5$ kg Körpergewicht verwendet. Das Kaninchenmodell ist in unserer Arbeitsgruppe schon seit Jahren erfolgreich etabliert, um chronische Ischämien zu simulieren^{16,151}.

2.2.1 Überblick

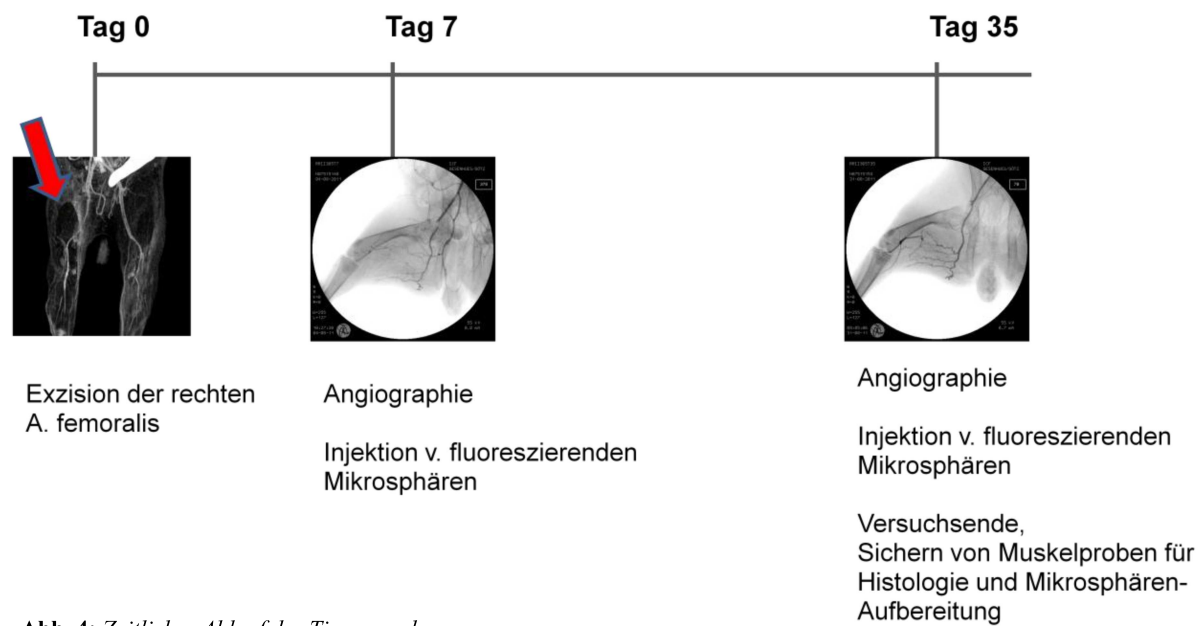


Abb. 4: Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs

An Tag 0 wurde die Ischämie durch Exzision der rechten A. femoralis induziert sowie die rAAVs intramuskulär in den rechten Unterschenkel injiziert. An Tag 7 wurden eine Angiographie des rechten und linken Beins, sowie eine Mikrosphärenmessung durchgeführt. An Tag 35 wurden Angiographie und Mikrosphärenmessung wiederholt, anschließend wurde das Tier für die Entnahme von Histologieproben getötet.

Versuchsgruppe	Therapie	Anzahl
Kontrolle	i.m. Injektion von 1 ml NaCl 0,9% an Tag 0	n = 6
Tß4 Tet	i.m. Injektion von 5×10^{12} AAV 2.9 Tß4 Tet an Tag 0 + Doxycyclin p.o. ab Tag 9 für jeweils 5 Tage mit 2 Tagen Pause im Intervall	n = 5
Tß4 + L-NAME	i.m. Injektion von 5×10^{12} AAV 2.9 Tß4 an Tag 0 + L-NAME p.o. ab Tag 7	n = 4
Ang2	i.m. Injektion von 5×10^{12} AAV 2.9 Ang2 an Tag 0	n = 4
Tß4 + Ang2	i.m. Injektion von 5×10^{12} AAV 2.9 Tß4 an Tag 0 + i.m. Injektion von 5×10^{12} AAV 2.9 Ang2 an Tag 0	n = 4
Tß4 + Ang2 Tet	i.m. Injektion von 5×10^{12} AAV 2.9 Tß4 an Tag 0 + i.m. Injektion von 5×10^{12} AAV 2.9 Ang2-Tet an Tag 0 + Doxycyclin p.o. ab Tag 13	n = 5

Tabelle 3: Übersicht der Versuchsgruppen

2.2.2 Anästhesie

Die Einleitung erfolgte intramuskulär mit einer Mischung aus 2 ml Ketamin-Inresa[®] (Ketaminhydrochlorid, Inresa GmbH), 1 ml Rompun[®] (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH), 0,03 ml Atropinsulfat (B. Braun Melsungen AG). Das schlafende Tier wurde anschließend in den OP gebracht, wo ein venöser Zugang mit einem 24G-PVK (BD Neoflon, 24G*0,75“, Becton-Dickinson GmbH) am rechten Ohr gelegt wurde. Durch diesen lief während der Operation eine TIVA (Total intravenöse Anästhesie) mit 8 ml Ketamin-Inresa[®], 5 ml Rompun[®], 43 ml NaCl 0,9% (B. Braun Melsungen AG) bei einer Geschwindigkeit von 13 ± 1 ml/h über einen Perfusor (Perfusor segura, B. Braun Melsungen AG). Herzfrequenz und Atmung wurden im Laufe der OP regelmäßig kontrolliert.

2.2.3 Induktion der Ischämie

Nach erfolgter Einleitung wurde das Tier gelagert, die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit einer feuchten Binde verbunden, die Schenkel-Innenseite des rechten Beins rasiert und gründlich desinfiziert. Anschließend wurde mit dem Skalpell (No. 22, Feather Safety Razor Co. LTD., Japan) ein Hautschnitt von proximal des Lig. inguinale entlang der Adduktorenloge bis ca. 3 cm unterhalb des Kniegelenks gesetzt. Nach stumpfer Freilegung der A. femoralis superior und ihrer Abgänge wurde diese vorsichtig von der V. femoralis superior und dem eng anliegenden, stellenweise auch kreuzenden N. ischiadicus getrennt. Anschließend wurden die Ligaturen 1-5 wie in Abb. 5 gezeigt der A. femoralis und ihren Abgängen unterlegt und die Gefäße anschließend mit 4,0 Seide (Perma Hand Seide, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Dann präparierte man am kaudalen Drittel des Oberschenkels stumpf in die Muskelloge, bis man auf die A. femoralis stieß und die Ligaturen 6-8 wie in der Abbildung setzte. Zuletzt wurde die A. femoralis auf Höhe des Kniespalts aufgesucht, stumpf von den begleitenden Venen getrennt und ebenfalls ligiert. Die A. femoralis wurde nun proximal der Ligatur Nr. 9 mit einer Klemme fixiert, und sowohl zwischen Klemme und Ligatur Nr. 9 als auch distal der Ligatur Nr. 8 durchgeschnitten. Das abgetrennte Arterienstück wurde unter gleichmäßigen Dreh- und Zugbewegungen aus dem Bindegewebe gezogen. Dann wurde die Klemme proximal der Ligatur Nr. 6 angelegt, die Arterie sowohl zwischen Klemme und Ligatur, als auch proximal der Ligatur Nr. 5 durchgeschnitten und das abgetrennte Teilstück auf die gleiche Art entfernt.

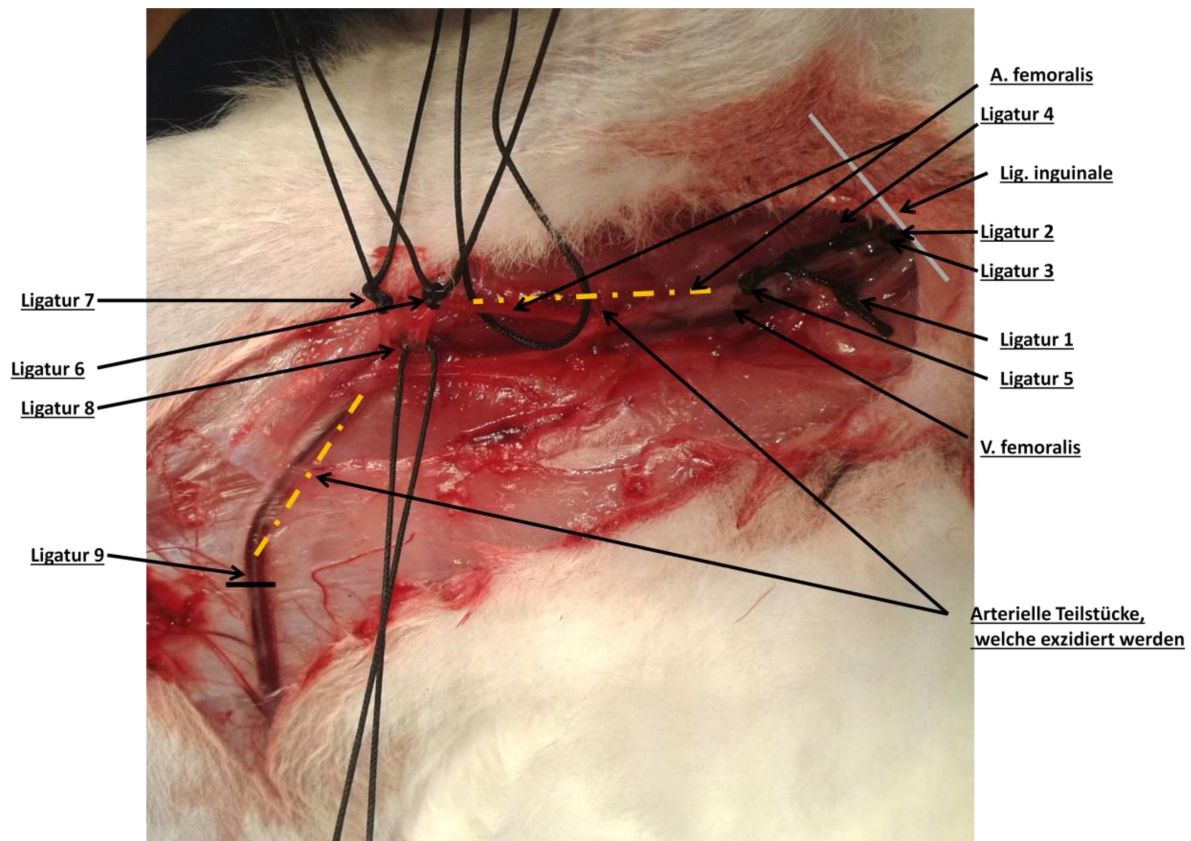


Abb. 5: Schematischer Überblick über die A. femoralis und die Ligaturstellen

Nach Ausschluss einer Blutung und gründlicher Spülung mit NaCl 0,9% wurde die Wunde mit einer Hautnaht verschlossen (Supolene DS40, 3.5 metric, Resorba GmbH). Das Tier erhielt eine Single-shot-Antibiose mit 1,5 mg Gentamicin (Gencin®, DeltaSelect, Deutschland) im linken Oberschenkel, um postoperativen Entzündungen vorzubeugen. Danach wurde die OP-Narbe mit Braunol (Povidon-Iod, B. Braun, Melsungen AG) desinfiziert und das operierte Bein mit einem Mullverband verbunden, für besseren Halt auch um den Rumpf des Kaninchens herum. Der Mullverband wurde noch mit Heftpflaster (Leukoplast Hospital 5 cm x 9,2 m, SSN medical, Deutschland) fixiert, wobei das Bein nicht zirkulär sondern längs umklebt und am Rumpf genügend Platz für eine entspannte Bauchatmung gelassen wurde. Das wiederverwendbare OP-Besteck wurde im Autoklaven sterilisiert.

Das Tier wurde zurück in seinen Stall gebracht und erhielt postoperativ für 3 Tage eine Analgesie mit Tramadol® 62,5 mg/d (Tramadolhydrochlorid, Grünenthal GmbH), welches dem Trinkwasser beigemischt wurde.

2.2.4 Therapie

Nachdem an Tag 0 das rechte Bein vernäht worden war und bevor der Verband angelegt wurde, wurden 5×10^{12} AAV (Tß4, Ang2 oder beides) mit NaCl 0,9% auf 1 ml verdünnt und intramuskulär an 10 unterschiedlichen Stellen in den rechten Unterschenkel injiziert. Für den LacZ-Nachweis wurden dem entsprechenden Kontrolltier an Tag 0 5×10^{12} LacZ-AAV an zehn Stellen in den linken Unterschenkel injiziert. Tieren der Kontrollgruppe wurde an Tag 0 1 ml NaCl 0,9% an zehn Stellen in den rechten Unterschenkel injiziert. Für die Intervalltherapie mit Tß4-tet (ab Tag 7: zwei Tage Überexpression, anschließend fünf Tage Suppression im Wechsel) wurde den Tieren in der Zeit des therapiefreien Intervalls 100 mg Doxycyclin pro 0,7 Liter Trinkwasser beigemischt. Das Trinkwasser wurde täglich gewechselt. Die Tß4 + Ang2-tet + Doxy-Gruppe bekam ab Tag 13 100ml Doxycyclin pro 0,7 Liter Trinkwasser beigemischt.

2.2.5 Mikrosphären-Messung

An Tag 7 und Tag 35 wurden den Kaninchen 3 ml fluoreszierende Mikrosphären („*FluoSpheres*“, $1,0 \times 10^6$ /ml, Invitrogen, Molecular Probes, USA) über einen Katheter in den linken Ventrikel injiziert, um später in der Auswertung die Durchblutung verschiedener Gewebe zum gleichen Zeitpunkt vergleichen zu können.

Die Anästhesie war identisch zu der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen von Tag 0.

Zusätzlich zur TIVA über das rechte Ohr hatten die Kaninchen einen arteriellen Zugang über einen 22G-PVK am linken Ohr, durch welchen während der Mikrosphären-Messung Blut als Referenzwert abgenommen wurde. Nach gründlicher Rasur und Desinfektion des Halses wurde ein ca. 3 cm großer Hautschnitt mit einer Schere über der A. carotis communis gesetzt (an Tag 7 erfolgte dieser rechts, an Tag 35 links) und stumpf die A. carotis communis in der Muskelloge auf ca. 2,5 cm freipräpariert. Diese wurde auf der kranialen Seite ligiert und leicht unter Zug gesetzt, kaudal nur lose mit einer zweiten Ligatur umschlungen und zur Unterbrechung des Blutflusses etwas angehoben. Die blutleere Arterie wurde mit einer Mikro-Federschere angeschnitten und eine Schleuse (Radifocus Introducer II, 4F, Terumo Europe N.V., Belgien) mit Mandrin und Führungsdraht ca. 4 cm tief eingeführt. Durch die kaudale Ligatur wurde die Arterie mit der Schleuse fixiert; die Ligaturenden wurden peripher an der Schleuse verknotet und diese mittels einer Klemme an der Augenbinde fixiert. Anschließend wurde der Führungsdraht aus der Schleuse entfernt und ein 4F-Katheter (Cordis Corp., USA) mit Führungsdraht (Größe 0,014“, Cordis Corp.) unter Röntgenkontrolle eines C-Bogens (Exposcop 800, Fa. Ziehm, Deutschland) in den linken Ventrikel vorgeschoben.

Zur Vermeidung von Herzspasmen wurde darauf geachtet, dass die Katheterspitze frei im Ventrikel schwamm und in der Diastole nicht einer Ventrikelwand anlag. Zudem wurden zur Vermeidung von Thromben Katheterdrähte und Katheter mit Heparin-Natrium (500 I.E./ml, B. Braun Melsungen AG) benetzt und gespült

Die Pumpe (Abzugsgerät der Firma Harvard Apparatus, USA), mit welcher die gleichmäßige Blutentnahme zur Referenzmessung der fluoreszierenden Mikrosphären durchgeführt wurde, wurde mit einer 50 ml Perfusorspritze bestückt. Die Spritze wiederum wurde mit 3 ml Natriumcitrat-Lösung 3,13% (Fa. Eifelfango, Deutschland) aufgezogen und mit einer Heidelberger Infusionsverlängerung verbunden. Die Natriumcitrat-Lösung wurde bis an die Spitze der Infusionsverlängerung gedrückt, um eine spätere Blutgerinnung darin zu vermeiden. Anschließend wurde die Infusionsverlängerung mit der 22G-PVK am linken Ohr verbunden und für wenige Sekunden der gleichmäßige Blutfluss bei eingeschalteter Pumpe sichergestellt.

Unterdessen wurden die fluoreszierenden Mikrosphären für die Anwendung vorbereitet durch 3 Min vortexen, 5 Min im Ultraschallbad und nochmal 3 Min vortexen. 3 ml der fluoreszierenden Mikrosphären wurden in eine 5 ml Spritze aufgezogen. Nun wurden die Mikrosphären gleichmäßig über 2 Min verteilt durch den Katheter in den linken Ventrikel appliziert. Parallel dazu wurden über 3 Min 6,18 ml Blut mit der Harvard-Pumpe abgezogen (Zugvolumen 2,06 ml/min). Nach Beendigung der Mikrosphären-Applikation wurde der Katheter entfernt und erneut mit Heparin-Natrium-Lösung durchgespült. Die Perfusor-Spritze wurde nach Ablauf der 3 Minuten zügig aus der Pumpe entfernt und das dort gesammelte Blut durch das in Kapitel 2.5 vorgestellte Filtersystem abgesaugt, um die fluoreszierenden Mikrosphären im Filter zu sammeln. Der Filter wurde anschließend lichtgeschützt bei 4°C bis zur Auswertung stehend aufbewahrt.

2.2.6 Angiographie

Führungsdraht und Katheter wurden unter Röntgenkontrolle über die Aorta descendens in die rechte A. iliaca eingeführt. Nach Zurückziehen des Führungsdrahtes, Fixierung der Beine und Positionierung des C-Bogens wurde die Aufnahme-Funktion (CINE) des C-Bogens gestartet. Nach zügiger Gabe von 0,5 ml Adrekar® (Sanofi-Aventis GmbH) und kurzem Nachspülen des Katheters mit 0,9% NaCl-Lösung wurde unter Durchleuchtung so lange Iopamidol (Solutrast 370, Bracco Imaging GmbH) gespritzt, bis es den Kniespalt erreichte (in der Regel 2-4 ml). Der Aufnahmemodus des C-Bogens wurde beendet und der Katheter mit 0,9% NaCl nachgespült. Der Vorgang wurde am linken Bein wiederholt. Daraufhin wurden Katheter und

Schleuse gezogen, die kaudale Ligatur der A. carotis verknötet und die Wunde gesäubert. Sie wurde anschließend vernäht und die Narbe mit Braunol® desinfiziert. Die TIVA wurde beendet und das Tier wieder in den Stall gebracht.

2.2.7 Versuchsende

An Tag 35 wurde oben beschriebene Prozedur wiederholt, jedoch diente als Zugang die A. carotis sinistra. Für die Mikrosphären wurde eine andere Farbe gewählt als an Tag 7, um in der Auswertung die beiden Tage vergleichen zu können. Nach Abschluss der Angiographien wurde der Katheter mit Führungsdraht erneut unter Röntgenkontrolle in den linken Ventrikel geführt. Das noch anästhesierte Tier wurde durch Injektion von 10 ml gesättigter Kaliumchloridlösung in den linken Ventrikel getötet. Anschließend wurden beidseits Muskelproben für Histologie, Mikrosphären-Messung und PCR aus M. tibialis anterior (TA), M. fibularis (FIB), M. gastrocnemius (GC), M. adduktor magnus (AD), M. vastus medialis (VM) entnommen sowie Proben aus Herz, Lunge, Milz, Leber und beiden Nieren. Die PCR-Proben wurden mit RNA-Later® in 1,5 ml Eppendorfgefäßen (Eppendorf AG) verschlossen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die ca. 2 cm großen Histologie-Proben wurden in Plastik-Kästchen verschlossen und anschließend in einem Stahlbehälter in 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH & Co. KG) eingelegt. Der Stahlbehälter wurde daraufhin ebenfalls in flüssigen Stickstoff gestellt. Dadurch wurde das Gewebe der Histologie-Proben unter Verdrängung des Wassers aus den Zellen gefroren, was der Qualität der späteren histologischen Aufarbeitung zugutekam. Die Gewebeproben für PCR und histologische Aufarbeitung wurden auf Trockeneis zu einem Eisschrank gebracht und dort bei -80°C aufbewahrt. Die Gewebeproben für die Mikrosphären-Messung wurden lichtgeschützt in 50-ml Falcon-Tubes (TPP AG, Schweiz) in 5%-Formalin-Lösung (Carl Roth GmbH & Co. KG) bei Raumtemperatur konserviert.

2.3 Kollateralenwachstum

Die Messung des Kollateralenwachstums wurde auf Basis des von Asarah et al. und Witzenbichler et al.^{152,153} beschriebenen Verfahrens eingesetzt: Es wurde ein Bild aus der Angiographie ausgewählt, in welchem alle Gefäße vom Leistenband bis zum Kniegelenk mit Kontrastmittel gefüllt waren. Über dieses wurde in Power Point (Microsoft, USA) ein standardisiertes Gitter gelegt, welches das Areal zwischen Leistenband und Kniegelenk abdeckte. Nun wurden alle Schnittpunkte dieses Gitters und der sichtbar mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße gezählt. Diese Werte wurden für das rechte und das linke Bein gemessen,

sowohl an Tag 7 als auch an Tag 35. Die Änderung der Anzahl an Schnittpunkten von Tag 7 zu Tag 35 wurde in Prozent des Wertes von Tag 7 angegeben.



Abb. 6: Kollateralenzählung an Tag 7 und Tag 35. In Power Point wird ein standardisiertes Gitter über das Bild gelegt und alle Schnittpunkte dieses Gitters mit den Kollateralen markiert und gezählt.

2.4 Blutflussgeschwindigkeit

Um den Blutfluss in den Kollateralen zu messen, wurden die Bilder der Cinedensometrie nach Gibson et al. und Dorsaz et al.^{154,155} ausgewertet: Es wurde die Anzahl der Bilder gezählt, die es brauchte, bis das Kontrastmittel von der Katheterspitze am Leistenband den Kniespalt erreichte. Diese Werte wurden für das rechte und linke Bein erhoben, sowohl an Tag 7 als auch an Tag 35. Bei konstanter Injektionsgeschwindigkeit und Aufnahme rate (25 Bilder pro Sekunde) wurde die Flussgeschwindigkeit anhand des linken, nicht-ischämischen Beines für jedes Tier normiert und die Werte des rechten, ischämischen Beines ins Verhältnis dazu gesetzt. Die Geschwindigkeitsänderung von Tag 7 zu Tag 35 wurde in Prozent von Tag 7 angegeben (nach Lebherz et al.)¹⁵⁶.

2.5 Blutflussmessung durch Mikrosphären

Als Goldstandard zur Bestimmung des regionalen Blutflusses gilt heute die in-vivo-Applikation von fluoreszierenden Mikrosphären. Mikrosphären sind mit Fluoreszenzfarbstoff beschichtete Polyethylen-Kügelchen, die mit 15,4 μm Durchmesser zu groß sind, um Kapillaren (Durchmesser $\sim 5\text{-}10\ \mu\text{m}$) zu passieren. Diese Eigenschaft machten wir uns zunutze, indem wir, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, 3 ml Mikrosphären in den linken Ventrikel applizierten und diese so in den großen Kreislauf gelangten. Durch Injektion von

unterschiedlichen Farben an Tag 7 und 35 war es möglich, mittels Fluoreszenzintensitätsmessung beider Farben ein genaues Bild des regionalen Blutflusses zum jeweiligen Zeitpunkt der Applikation zu bekommen. Die Aufbereitung der Mikrosphären wurde abgewandelt vom Verfahren von Raab et al.¹⁵⁷ durchgeführt:

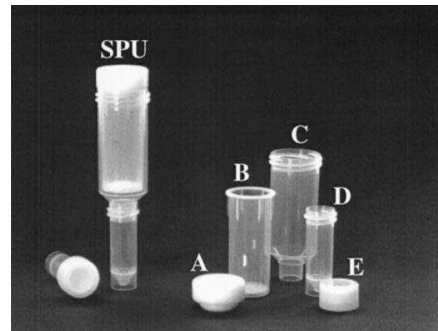


Abb. 7: Das Filtersystem *SPU* (= Sample Processing Unit) aus Raab et al.¹⁵⁷:

B hat am Boden einen Filter mit einer Porengröße von 7 μm und einem Durchmesser von knapp 2,5 cm. *B* passt genau in *C*, welches oben mit dem Schraubdeckel *A* verschlossen wird. *D* und *E* werden von unten auf *C* aufgesteckt

Es wurden die Heizblöcke (Fa. Perkin-Elmer, Deutschland) vorbereitet, in deren Stahlzylindern exakt passende Mikrosphären-Filter (SEFAR AG, Schweiz) platziert wurden (Filter B aus Abb. 7). Anschließend wurden 1g bis 1,5g schwere Stücke von den in 5%-Formalin fixierten Muskelproben geschnitten, gewogen und in jeweils einen Filter gelegt. Danach wurden in jeden Filter 15 ml Kalilauge 4M gegeben, damit die Mikrosphären nicht an der Filterwand anhaften (224g KOH Pellets (Merck KGaA, Deutschland) + 20 ml 2%-Tween80 (Roth, Deutschland)/l Aqua dest.). Die KOH-Lösung wurde mit 3 ml 100% Isopropanol (Roth, Deutschland) luftdicht abgedeckt, um eine Kristallisation des KOH zu verhindern. Anschließend wurden die Zylinder mit Kunststoffdeckeln geschlossen und die Proben für 12 Stunden bei 60°C verdaut.

Die Filter wurden danach in eine exakt passende 20ml Spritze gesteckt und die verdaute Lösung von einer daran angeschlossenen Vakuumpumpe abgesaugt. Um verbliebene Laugenreste von der Filterwand zu neutralisieren, wurde der Filter gründlich von innen und außen mit phosphatgepufferter Salzlösung (29,8 g di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat und 5,55g Kaliumhydrogenphosphat, in 1000 ml Aqua dest. gelöst; Apotheke Innenstadt des Klinikums der Universität München) gespült und in neue 50-ml Falcon-Tubes gesteckt.

In einem weiteren Schritt wurden den Filtern mit den nun verdauten Muskelproben sowie den Blut-Referenzwert-Filtern von Tag 7 und Tag 35 (vgl. Kapitel 2.2.5) 2 ml Cell Solve (2-Ethoxyethyl Acetat, Sigma-Aldrich, Deutschland) hinzugegeben. Dies löst den Fluoreszenzfarbstoff aus den bis jetzt im Filter verbliebenen Mikrosphären. Die Falcon-Tubes wurden für 3 Min bei 3000 rpm zentrifugiert und die Filter mit den nun farblosen Mikrosphären entfernt. Aus jedem Falcon-Tube wurden 100 µl der fluoreszierenden Lösung in eine 96-Well-Platte (TPP AG) pipettiert. Diese wurde in einem automatischen Mikroplattenlesegerät (Safire 2, TECAN GmbH, Deutschland) ausgelesen, welches die Fluoreszenz-Intensität verschiedener Farbspektren in jedem Well misst. Die gemessenen Daten wurden von der XFluor4-Software (Version 4.62, TECAN GmbH) gespeichert und in Microsoft Excel ausgewertet. Der regionale Blutfluss wurde als Verhältnis der Fluoreszenz des rechten Beines zum linken von Tag 35 und Tag 7 bestimmt.

2.6 Histologie

2.6.1 Kapillarwachstum

Die Muskelproben wurden bei -80°C gelagert. Es wurden alle entnommenen Beinmuskeln beider Seiten untersucht. Sie wurden bei -20°C mit Tissue Tek (Sakura Finetek Europe, Niederlande) auf Objektträgern fixiert, mit dem Messer senkrecht zur Verlaufsrichtung der Muskelfasern, um einen geraden Anschnitt der parallel verlaufenden Kapillaren zu gewährleisten. Mit einem Kryotom CM 3050 (Leica Biosystems, Nussloch) wurden je sieben 5 µm dicke Muskelschnitte angefertigt und auf Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) übertragen. Die Schnitte wurden bei 4°C gelagert. Zum Kapillarnachweis wurden die Schnitte mit Alkalischer Phosphatase, einem Endothelzellmarker, gefärbt (AP-Färbung, siehe Kapitel 2.6.2). Für die Bestimmung der Gefäßmaturation durch Differenzierung zwischen Kapillaren (nur Endothelzellen) und reiferen Gefäßen (welche Endothel und eine Schicht glatter Muskelfasern haben) diente eine Immunhistochemie mit Antikörpern gegen CD-31, ebenfalls ein Endothel-spezifisches Protein und NG2, ein Proteoglycan, welches u.a. in Perizyten vorkommt (Pecam-NG2-Färbung, siehe Kapitel 2.6.3)

2.6.2 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Färbung wurde wie von Ziada et al.¹⁵⁸ beschrieben durchgeführt: In 30 ml Pufferlösung wurden 6 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin-Salz (Sigma Aldrich) und 30 mg Nitrotetrazolium blue chloride (~98%, Sigma Aldrich) gelöst. Um den Puffer herzustellen, wurden 17 mg Magnesiumsulfat (Merck, Deutschland) in 100 ml Aqua dest. gelöst und anschließend auf 1:100 verdünnt. Danach wurden 1,05 g di-Natriumtetraborat (Merck)

beigegeben und vermischt. Der Puffer hatte einen pH-Wert von $9,3 \pm 0,1$. Jeweils ca. 1 ml der Lösung wurde auf die Muskelschnitte pipettiert und inkubierte anschließend eine Stunde in der Feuchtkammer bei 37°C. Die Färbelösung wurde abgeklopft, die Objektträger dreimal in PBS geschwenkt und 5 Min in 4% Formalin-Lösung fixiert. Dann wurden die Objektträger eine Minute in Aqua dest. gewaschen, eine Minute in 0,1%-Kernechtrot-Lösung gegengefärbt, nochmal eine Minute in Aqua dest. gewaschen und anschließend abgeklopft und luftgetrocknet. Bis zur Analyse lagerten sie bei 4°C.

Von den Muskelschnitten wurden an einem AxioVert-100-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung sieben Bilder von zufälligen Blickfeldern gemacht und jeweils Kapillaren und Muskelfasern gezählt. Zur Analyse wurde das Programm KANINCHEN v.1.7 (Georg Stachel, 2010) genutzt. Nach Brown et al.¹⁵⁹ wurde die Kapillardichte bestimmt durch den Mittelwert der in sieben Bildern gezählten Kapillaren im Verhältnis zu den jeweilig gezählten Muskelfasern.

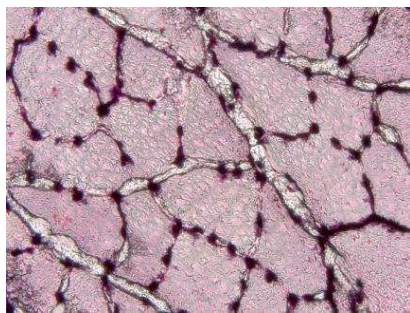


Abb. 8: 40-fache Vergrößerung des *M. fibularis*. Die Kapillaren sind schwarz gefärbt.

2.6.3 Pecam-NG2-Färbung

Mit Immunhistochemie kann man auf einem Muskelschnitt verschiedene Zellarten gleichzeitig darstellen. Wir nutzten rot markierte Anti-CD31-Antikörper (Pecam-1) zum Nachweis von Endothelzellen¹⁶⁰, grün markierte NG2-Antikörper zum Nachweis von Perizyten^{161,162} sowie blau fluoreszierendes DAPI (4',6-Diamin-2-phenylindol; Vector Labs, USA) zum Nachweis von Zellkernen.

Die Objektträger wurden 15 Minuten in 4°C kaltem Aceton fixiert, anschließend die einzelnen Muskelschnitte mit einem hydrophoben Marker (Dako GmbH, Deutschland) umfahren und danach mit Blocking-Lösung (2% BSA in PBS) bedeckt. Diese verhindert unspezifische Antikörperbindungen und übermäßige Hintergrundfluoreszenz. Nach einer Stunde wurde die Blocking-Lösung abgeklopft und der primäre Antikörper aufpipettiert (Mouse anti-CD31 (JC/70a), Abcam [ab9498], 1:80 in Antibody Diluent (Dako GmbH),

~0,4 ml / Muskelschnitt). Dieser inkubierte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde der sekundäre, fluoreszierende Antikörper aufpipettiert (Alexa Fluor 594 Anti-mouse; origin: goat; Molecular Probes (A11005); 1:200 in Antibody Diluent; ~0,4 ml / Muskelschnitt) und inkubierte für zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger lichtgeschützt 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und getrocknet.

Nun wurde der zweite primäre Antikörper aufgetragen (Anti-NG2-chondroitin (rabbit) / Millipore 488 AB5320 labeled; 1:200 in Antibody Diluent; ~0,4 ml / Muskelschnitt) und inkubierte bei 4°C lichtgeschützt über Nacht.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger lichtgeschützt 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen, getrocknet, mit einer dünnen Schicht DAPI bedeckt und mit einem Deckglas abgedichtet. Nach gleichmäßiger Verteilung von DAPI über die Muskelschnitte wurden die Fugen zwischen Objektträger und Deckglas mit Nagellack versiegelt und der Nagellack lichtgeschützt an der Luft getrocknet.

Das Markieren des Anti-NG2-chondroitin-Antikörpers erfolgte mit einem Labeling-Kit von Innova Biosciences (733-0010 Lightning Link Atto 488 Labeling Kit).

Für Bildaufnahmen diente ein Axioskop-2-Mikroskop (Carl Zeiss AG) mit 20-facher Verstärkung. Pro Muskel wurden sechs zufällige Blickfelder fotografiert. Jedes Blickfeld wurde in grüner, roter und blauer Fluoreszenz fotografiert und anschließend mittels Zeiss Axio Vision V. 4.9 (Carl Zeiss AG) übereinandergelegt.

Die Bilder wurden daraufhin in Photoshop CS5 (Adobe, USA) getrennt für Pecam-1- und NG2- Signale ausgewertet. Die Kapillaren und Perizyten wurden nach Brown et al.¹⁵⁹ durch den Mittelwert der in sechs Bildern gezählten Kapillaren und Perizyten zueinander ins Verhältnis gesetzt, um den Anteil reifer Gefäße zu bestimmen. Exemplarisch wurde für jedes Tier der rechte M. gastrocnemius ausgewertet.

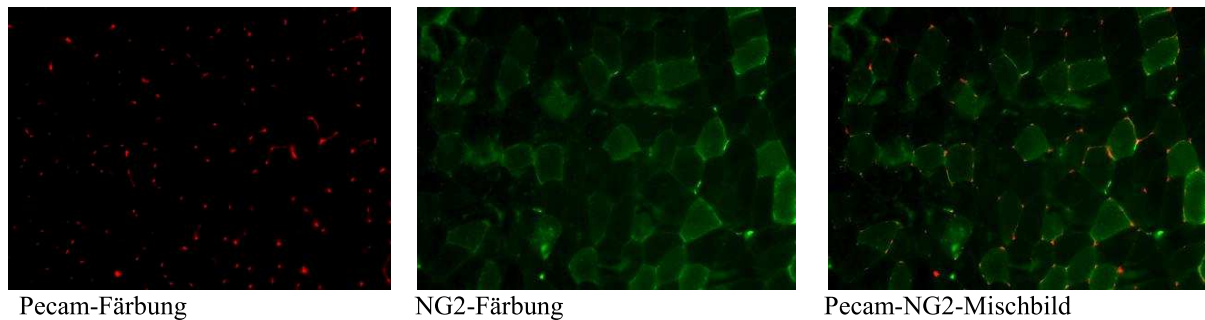


Abb. 9: Pecam-/NG2-Färbung des *M. gastrocnemius*. Die Bilder der angefärbten Endothelzellen und Perizyten werden einzeln ausgezählt und anschließend übereinander gelegt.

2.6.4 β -Galaktosidase-Färbung

Um nachzuweisen, dass die AAVs regelrecht in den Myozyten um die Injektionsstelle herum exprimieren, wurde 5×10^{12} AAV-2/9-LacZ wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben in den linken Unterschenkel injiziert. Nach Tag 35 wurden sowohl Unterschenkelmuskeln als auch Oberschenkelmuskeln beider Beine β -Galaktosidase-gefärbt.

Für die histologische Analyse wurden die Objektträger mit 0,5% Glutaraldehydlösung (25% Glutaraldehyd gelöst in PBS⁺ (100ml PBS + 1M MgCl₂ (100 μ l))) bedeckt (0,5 ml / Muskelschnitt) und inkubierten 10-15 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurde die Lösung abgeklopft. Nun wurde 0,3 ml X-Gal-Färbelösung pro Muskelschnitt dazugegeben und in der Feuchtkammer bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger einmal in PBS geschwenkt, danach an der Luft getrocknet. Die X-Gal Färbelösung wurde aus 20 ml PBS⁺, 0,5 ml 40-fach X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) sowie 1 ml 20-fach KC hergestellt. 20-fach KC wiederum bestand aus 0,82g Kaliumhexacyanidoferrat(III) und 1,05g Kaliumhexacyanidoferrat(II), welche in 25 ml PBS gelöst wurden.

Für die Analyse diente ein Axioskop-2-Mikroskop mit 40-facher Verstärkung.

2.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Real time polymerase chain reaction (Rt-PCR) dient dem RNA-Nachweis im Gewebe. Wir wollten die erfolgreiche Überexpression von Angiopoietin-2 und Thymosin- β 4 nachweisen.

Gewebepräparation und Total-RNA-Präparation

Je ein Gewebestück wurde in ein mit 1 ml Trizol (Ambion, USA) gefülltes, autoklaviertes Reagenzglas gelegt. Dann wurden die Gewebeproben mit einem Ultra-Turrox (IKA GmbH,

Deutschland) zerkleinert, welcher zwischen jeder Probe in Diethylpyrocarbonat (DEPC) gereinigt wurde. Anschließend wurden 200µl Chloroform/ml Trizol hineinpipettiert, die Mischung in je ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und dieses leicht geschüttelt.

Das Eppendorfgefäß wurde bei 12.000rpm in 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand (die RNA-Phase) in ein weiteres Eppendorfgefäß umpipettiert und das Pellet (Protein- und DNA-Phase mit Trizol) mit dem alten Eppendorfgefäß entsorgt. Der RNA wurde 8x/ Isopropanol (96%) hinzugefügt. Zur Ausfällung der RNA wurde das Eppendorfgefäß gevortext und erneut bei 12.000rpm in 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die verbliebenen Pellets wurden mit 1 ml Ethanol 75% gewaschen, die Eppendorfgefäße gevortext und anschließend für 2 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde ausgeschüttet, das Eppendorfgefäß nochmals eine Minute zentrifugiert und der neu aufgetretene Überstand vorsichtig abpipettiert. Die Pellets trockneten 10 Minuten mit offenem Deckel bei 40°C in einem Heizblock (Eppendorf AG), anschließend wurden abhängig von der Pellet-Größe 40-80 µl Nuclease free water (NFW; Promega, USA) pro Eppendorfgefäß hinzugegeben. Die Eppendorfgefäße wurden erneut kurz gevortext und einige Sekunden zentrifugiert. Von ihrem Inhalt wurden je 5 µl zu je 495 µl NFW (1:100) pipettiert.

Die Lichtabsorption wurde im Photometer (Ultrospec plus, Pharmacia LKB, Schweden) gemessen. Alle Proben wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen, mit Aqua dest. als Referenz. Für jede Probe wurde der Quotient $\frac{I(260nm)}{I(280nm)}$ herangezogen (idealerweise 1,8 – 2,0), um die Reinheit zu bestimmen.

DNase-Verdauung

Für die DNase-Verdauung wurden alle Proben mit NFW auf 1µg (entspricht ca. 3 µl) eingestellt. Dann wurden 1 µl Puffer (10x), 1 µl DNase (2 nM), 7 µl NFW (Puffer und DNase im Kit von Invitrogen, USA) hinzugegeben und die Lösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 1 µl EDTA gestoppt. Daraufhin wurden die Eppendorfgefäße einige Sekunden zentrifugiert, inkubierten nochmals für 10 Minuten bei 70°C und lagerten anschließend 5 Minuten auf Eis. 1 µl wurde entnommen, um später zu kontrollieren, dass die Lösung frei von DNA war; die restlichen 10 µl wurden in cDNA umgeschrieben.

Reverse Transkription

Der Reverse-Transkription-Mix (Promega, USA) bestand für jede Probe aus

- 2 µl 10x Reverse Transkription Puffer
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl Random Primer
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 0,6 µl AMV Reverse Transkription Polymer

Dieser Mix wurde mit 10 µl RNA gemischt, geschüttelt und 5 Minuten auf Eis gelagert. Dann wurden die Eppendorfgefäße einige Sekunden zentrifugiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend inkubierten die Proben für 40 Minuten bei 42°C, wurden für 5 Minuten bei 95°C inaktiviert und danach 5 Minuten auf Eis gelagert.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Der PCR-Mix (Biorad, Deutschland) bestand für jede Probe aus

- 10 µl IQ SYBR G-Super Mix
- 2,5 µl Primer Mix (10 pmol)
- 6 µl NFW

Zu diesem wurden 1,5 µl cDNA pipettiert, sodass jedes Eppendorfgefäß 20 µl enthielt. Anschließend wurden die Proben in die PCR-Eppendorfgefäße pipettiert, 5 Minuten bei 2.000rpm zentrifugiert und die PCR mit MyIQ von Bio-Rad gestartet.

Die getesteten Gene wurden mit GAPDH (ein ubiquitär vorkommendes housekeeper-Gen) als Referenz verglichen: In Microsoft Excel wurde der logarithmische Wert der Differenz des getesteten Gens zum GAPDH-Wert errechnet und als Ergebnis genommen.

3 Ergebnisse

3.1 Translation der AAVs

3.1.1 β -Galaktosidase-Färbung

35 Tage nach Injektion von 3×10^{12} AAV-2/9-LacZ in den linken Unterschenkel und PBS in den rechten Unterschenkel wurden beidseits der M. tibialis anterior und M. adductor magnus mit β -Galaktosidase gefärbt und verglichen. Nur im linken Unterschenkel zeigte sich eine LacZ-positive Anfärbung von Myozyten. LacZ war weder auf der kontralateralen Seite noch in der Oberschenkelmuskulatur nachzuweisen.

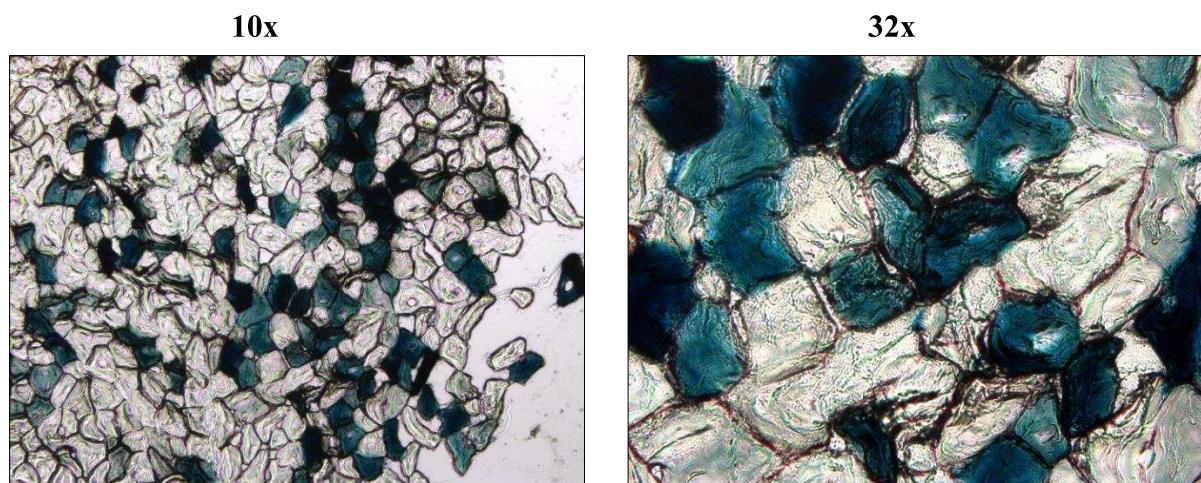


Abb. 10 Die Myozyten, in welchen LacZ exprimiert wird, sind nach β -Galaktosidase-Färbung blau.

3.1.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Nach Injektion von 5×10^{12} AAV 2/9 in den rechten Unterschenkel (vgl. Kapitel 2.2.4) wurde die AAV-vermittelte T β 4- und Ang-2-Expression von sechs Tieren sowohl im TA als auch GC gemessen und mit sechs Tieren der Kontrollgruppe verglichen. Die Werte wurden zu GAPDH normalisiert und logarithmiert. Sowohl T β 4 ($0,44 \pm 0,019$) als auch Ang2 ($0,0033 \pm 0,0013$) wurden signifikant überexprimiert gegenüber den Kontrollen (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

Exemplarisch wurden an einem Tier alle Muskeln des Hinterlaufs mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf Ang2-Expression untersucht: Im rechten Unterschenkel, besonders im M. fibularis konnte mit 0,012 zu 0,004 ein 3-facher Ang-2-Spiegel im Vergleich zum linken festgestellt werden. Die Werte der Oberschenkelmuskeln beidseits sind vergleichbar mit der Negativ-Kontrolle eines Tieres, welches nicht mit rAAV-Ang-2 therapiert wurde.

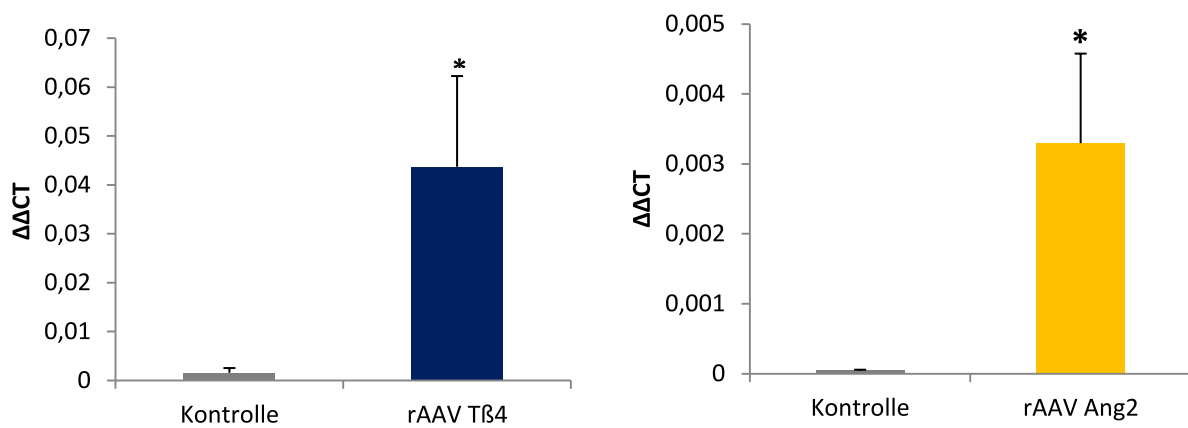


Abb. 11: Quantitative Echtzeit-PCR: Die Tβ4-Spiegel (links) wie auch Ang2-Spiegel (rechts) sind im Unterschenkel der Therapiegruppen signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

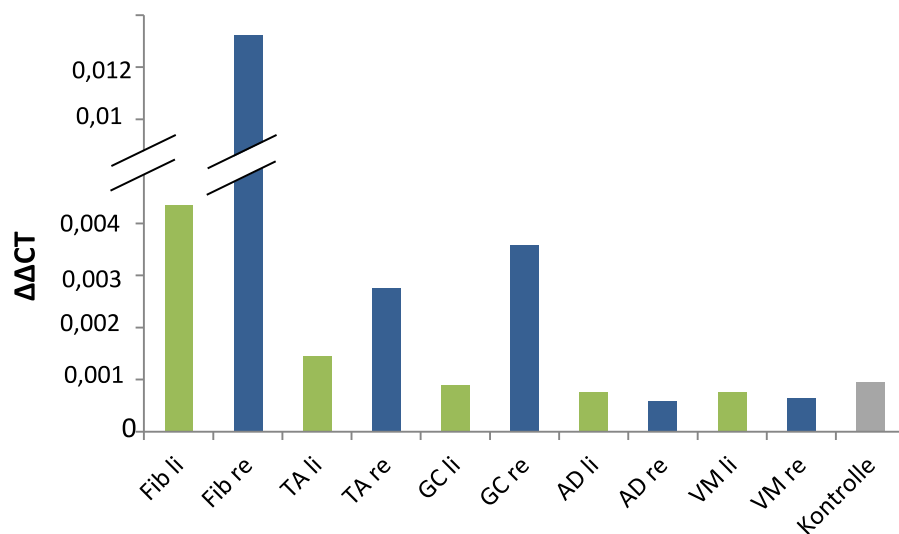


Abb. 12: Quantitative Echtzeit-PCR. Die Ang-2-Spiegel des rechten Unterschenkels sind bis zu 3-fach erhöht gegenüber den Werten des linken Unterschenkels. Die Werte der Oberschenkel entsprechen denen der Negativkontrolle (Tier ohne Ang2-Therapie).

3.2 Funktioneller Effekt von intermittierender Tβ4-Expression

Tβ4 fördert bekanntermaßen Angiogenese und Arteriogenese und hat über CCN1 und CCN2 Einfluss auf die Extrazellulärmatrix⁷³. Es sollte überprüft werden, ob die funktionellen Ergebnisse der konstanten Tβ4-Überexpression zu verbessern sind, wenn das Protein nur im Intervall exprimiert wird für den Fall, dass eine konstante Tβ4-Überexpression die Gefäßwände zu stark oder zu schnell abdichtet. Ab Tag 7 wurde die Tβ4-Überexpression im Wechsel für jeweils 2 Tage zugelassen, anschließend für 5 Tage unterdrückt.

3.2.1 Kapillarwachstum

Die Kapillardichte wurde als Parameter für die Angiogenese herangezogen. Die Tβ4-Überexpression im Intervall führte zu einer unbedeutenden Zunahme der Kapillardichte gegenüber der konstanten Überexpression ($2,10 \pm 0,29$ vs. $2,08 \pm 0,16$) im rechten Unterschenkel. In der Kontrollgruppe wurden signifikant weniger Kapillaren gebildet ($1,35 \pm 0,14$) (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,001$).

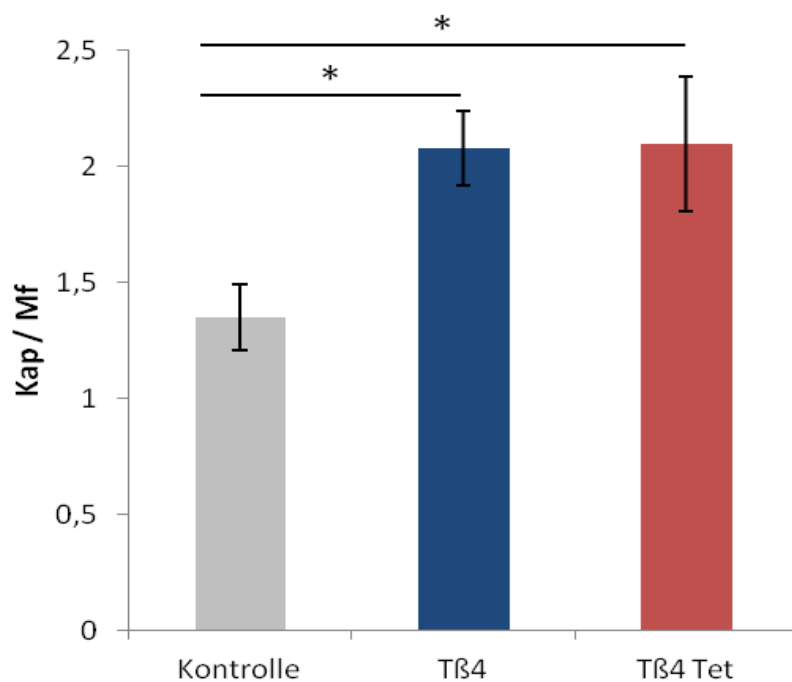


Abb. 13: Dargestellt ist die Kapillaren – Muskelfaser – Ratio im rechten Unterschenkel. Die Intervall-Therapie führte zu keiner nennenswerten Änderung der Kapillardichte im Vergleich zur Dauertherapie. Beide Therapien waren signifikant besser als die Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,001$.

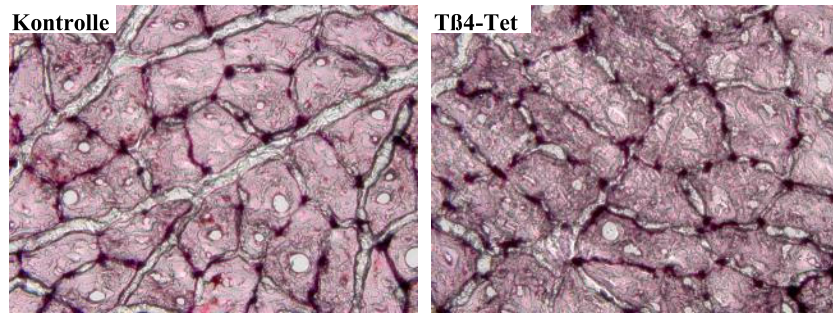


Abb. 14: Repräsentative Beispielbilder des AP-gefärbten *M. fibularis* der jeweiligen Versuchsgruppe.

3.2.2 Kapillarreifung

Die NG2/Pecam-1-Ratio wurde als Parameter der Kapillarmaturation herangezogen. In der Pecan-NG2-Färbung der Tβ4-Tet-Gruppe wurden pro Kapillare $0,39 \pm 0,05$ Perizyten gebildet gegenüber $0,51 \pm 0,03$ Perizyten in der Tβ4-Gruppe. Die Kontrollgruppe dagegen hat nur $0,33 \pm 0,02$ Perizyten pro Kapillare und zeigt eine signifikant schlechtere Maturation als die Therapie mit Tβ4 (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,001$).

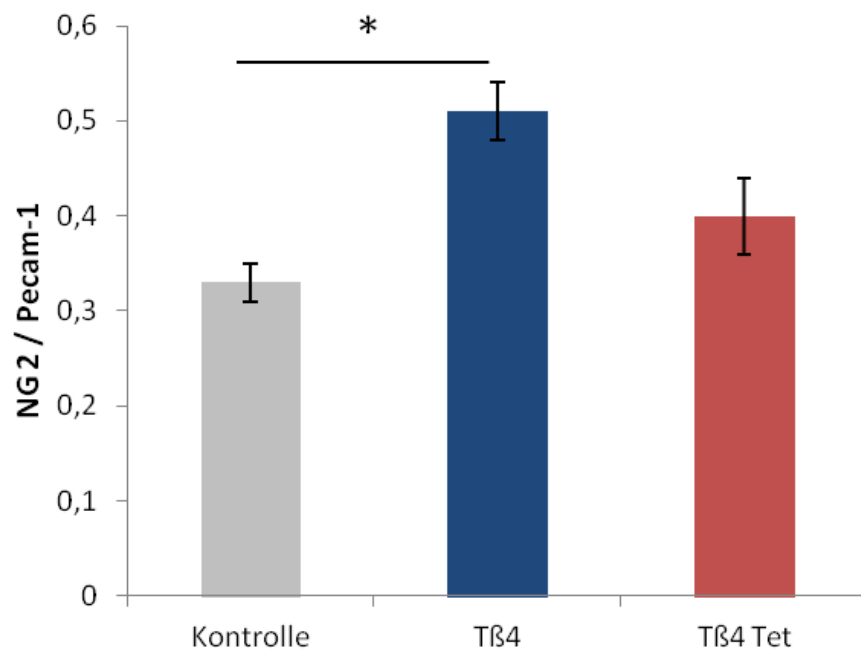


Abb. 15: Die Maturation der Kapillaren anhand des Verhältnisses von Perizyten (NG2) zu Kapillaren (Pecam-1) an Tag 35. Die Tβ4-Gruppe zeigt die ausgeprägteste Maturation, vor der Tβ4-Tet-Gruppe und mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,001$.

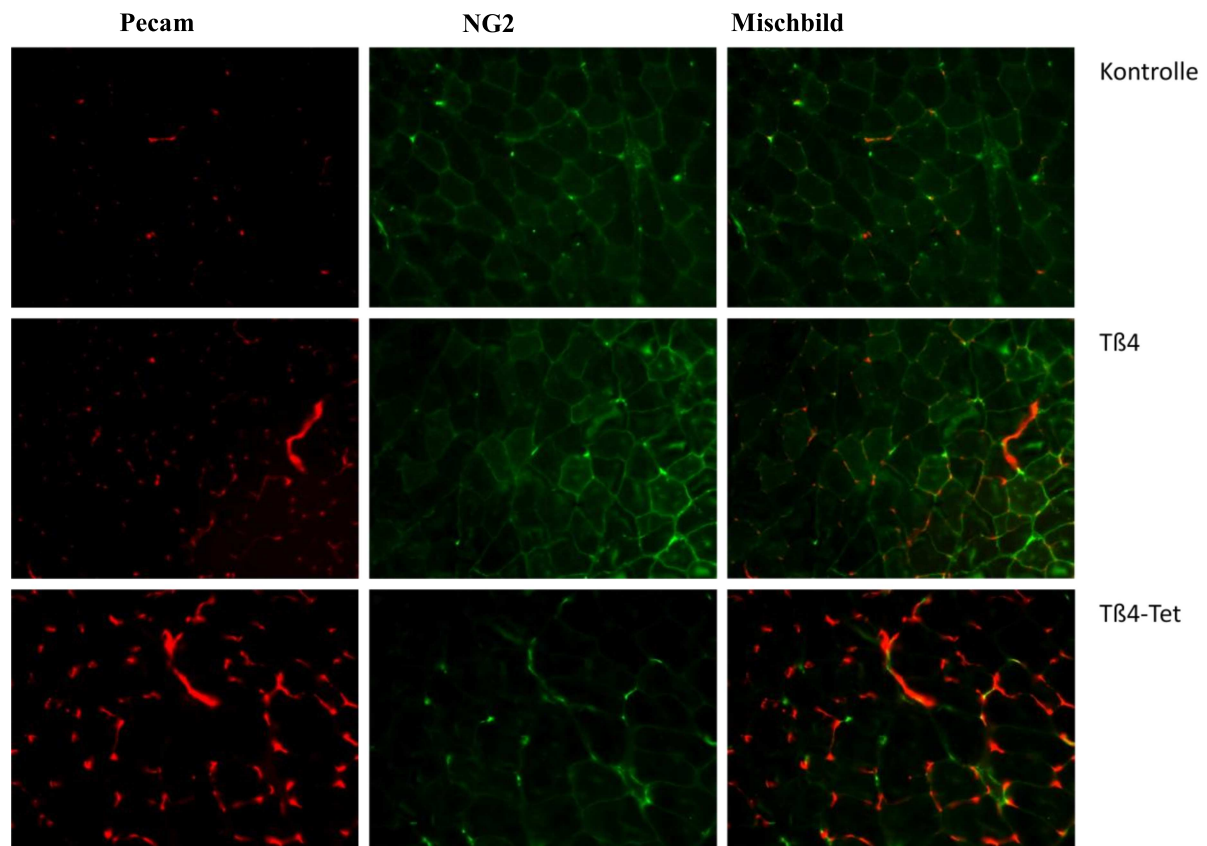


Abb. 16: Immunfluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von *Pecam-1* und *NG2* der Kontrollgruppe, der Tβ4- und der Tβ4-Tet-Gruppe. Man sieht deutlich mehr Kapillaren und Perizyten in den Tβ4-Gruppen als in der Kontrollgruppe. Tβ4 hat etwas mehr Perizyten als Tβ4-Tet.

3.2.3 Kollateralenwachstum

Die Zunahme der Kollateralen im Oberschenkel dient als Parameter der Arteriogenese, abhängig von der Angiogenese des ischämischen Unterschenkels. Die Kollateralen nehmen in der Tβ4-Tet-Gruppe von Tag 7 zu Tag 35 um 34% zu ($134,77\% \pm 4,6$), gegenüber einer Zunahme von 72% ($172,58\% \pm 13,05$) in der Tβ4-Gruppe. Die Kontrollgruppe zeigt eine Zunahme der Kollateralen auf $103,69\% \pm 5,68$. Die kontinuierliche Tβ4-Therapie bewirkt ein signifikant besseres Kollateralenwachstum als die Kontrollgruppe. Auch bei der intermittierenden Tβ4-Therapie ist das Kollateralenwachstum signifikant reduziert (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

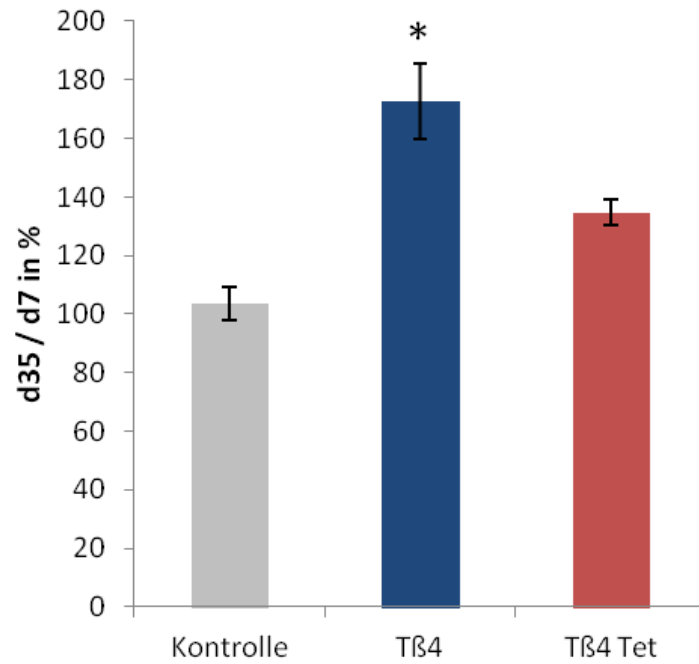


Abb. 17: Anzahl der Kollateralen an Tag 35 in % zu Tag 7. Die kontinuierliche Tβ4-Therapie bewirkt ein signifikant besseres Kollateralenwachstum als die Kontrollgruppe, jedoch auch gegenüber der intermittierenden Tβ4-Therapie ist der Unterschied signifikant. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

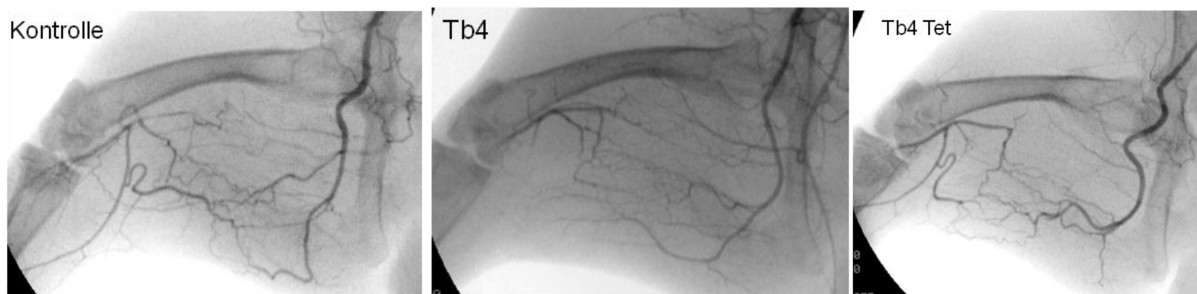


Abb. 18: CT-Angiographie-Bilder des Kollateralwachstums der verschiedenen Gruppen im Vergleich.

3.2.4 Analyse der Blutflussgeschwindigkeit

Analog der Zunahme an Kollateralen dient die cinedensometrische Erfassung der Flussgeschwindigkeit durch diese Kollateralen als weiterer Parameter der Arteriogenese im Oberschenkel. In den Cinedensometrie-Aufnahmen verzeichnet die T β 4-Tet-Gruppe mit $174,26\% \pm 7,92$ Durchflussgeschwindigkeit gegenüber Tag 7 eine langsamere Steigerung als die T β 4-Referenzgruppe ($187,49\% \pm 7,46$), der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Kontrollgruppe ist mit $108,13\% \pm 11,73$ signifikant schlechter als beide T β 4-Gruppen (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

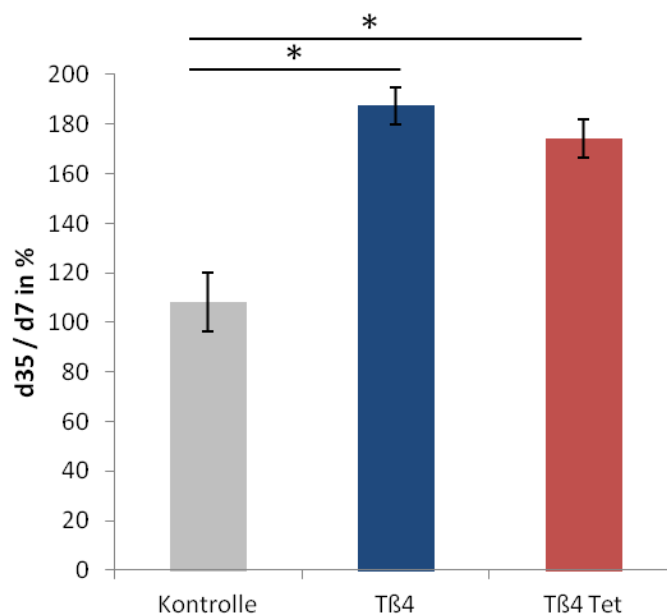


Abb. 19: Steigerung der Blutflussgeschwindigkeit an Tag 35 in % von Tag 7 im Vergleich. Die Steigerung ist in der T β 4-Gruppe und in der T β 4-Tet-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

3.2.5 Analyse der Perfusion

Die Messung von Mikrosphären stellt derzeit den Goldstandard der Perfusionsmessung dar. In der quantitativen Mikrosphären-Auswertung zeigt sich eine Zunahme der Unterschenkelperfusion in der T β 4 Tet-Gruppe auf $126,93\% \pm 3,33$, im Vergleich dazu die T β 4-Gruppe mit $144,67\% \pm 4,99$. Der Unterschied zeigt keine Signifikanz. In der Kontrollgruppe steigt die Perfusion auf $109,23\% \pm 3,57$, ein signifikant schlechteres Ergebnis gegenüber der T β 4-Therapie. (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,001$).

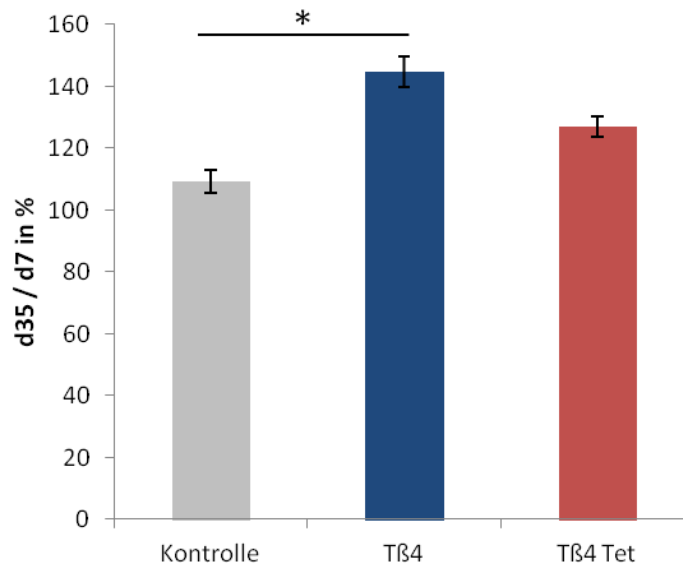


Abb. 20: Die Perfusionssteigerung von Tag 7 zu Tag 35 im rechten Bein ist in beiden Tβ4-Gruppen größer als in der Kontrollgruppe, jedoch zeigt nur die Zunahme in der Tβ4-Gruppe eine Signifikanz zur Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen den Tβ4-Therapien ist nicht signifikant. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,001$.

3.3 Funktioneller Effekt von Tβ4 mit Ang2

Es sollte untersucht werden, ob sich die funktionellen Effekte von Tβ4 verbessern lassen, indem man gleichzeitig Ang2 überexprimiert, um die Kapillarsprossung durch Destabilisierung der reifen Kapillaren zu erleichtern. Eine Kontrollgruppe wurde nur mit Ang2 und eine weitere Vergleichsgruppe mit Ang2-Tet und Tβ4 bis Tag 12 therapiert, anschließend die Ang2-Überexpression durch Doxycyclingabe unterbunden und die Therapie mit Tβ4 bis Tag 35 fortgesetzt (siehe Abb. 21).

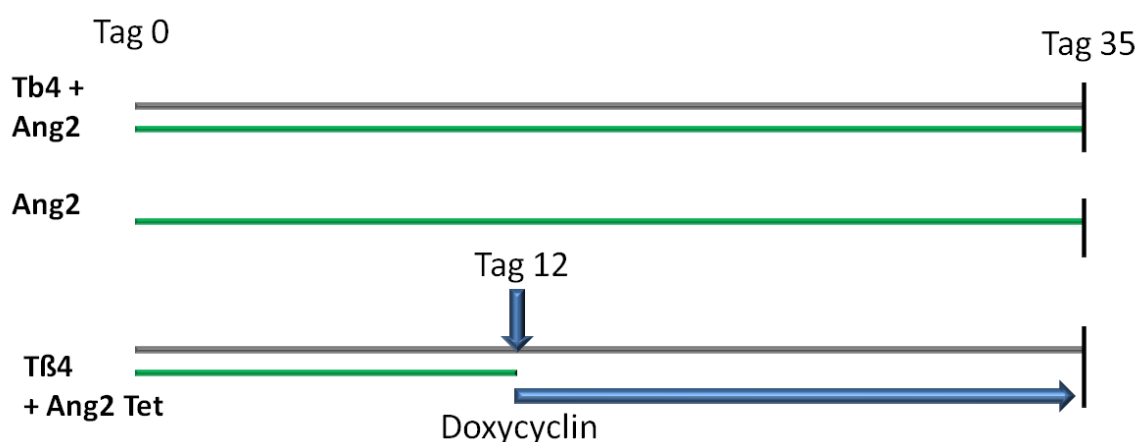


Abb. 21: Verlauf der Tβ4+Ang2-Tet-Gruppe im Vergleich zu Tβ4+Ang2 und ausschließlich Ang2.

3.3.1 Kapillarwachstum

Die Ang2-Therapie führt mit $1,52 \pm 0,21$ Kapillaren/Muskelfaser nur zu einer leichten Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe ($1,35 \pm 0,14$). T β 4+Ang2 führt zu $2,04 \pm 0,36$ Kapillaren/Muskelfaser, dieses Ergebnis liegt gleichauf mit der T β 4-Therapie ($2,08 \pm 0,16$). T β 4+Ang2-Tet führt mit $1,87 \pm 0,26$ Kapillaren/Muskelfaser zu einem insignifikant geringeren Wachstum. Nur die T β 4- und T β 4+Ang2-Therapien bewirken einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Zwischen den verschiedenen Vergleichsgruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ zur Kontrolle).

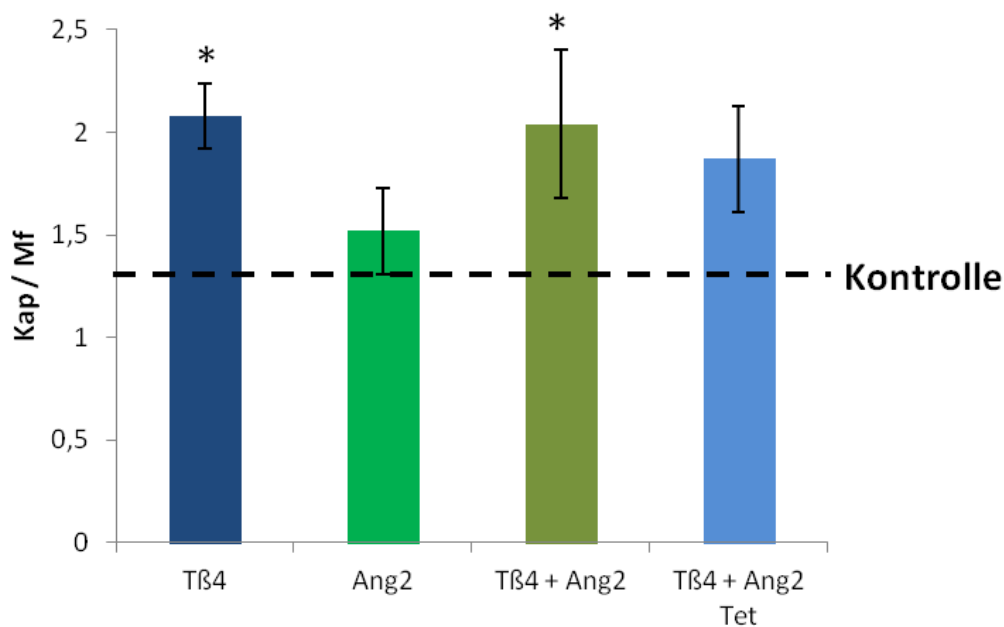


Abb. 22: Sowohl die T β 4- als auch die T β 4+Ang2-Therapie bewirken eine signifikante Zunahme der Kapillardichte gegenüber der Kontrollgruppe. Die Ang2- und T β 4+Ang2-Tet-Therapien liegen dazwischen ohne signifikanten Unterschied zu den Vergleichsgruppen. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ zur Kontrolle.

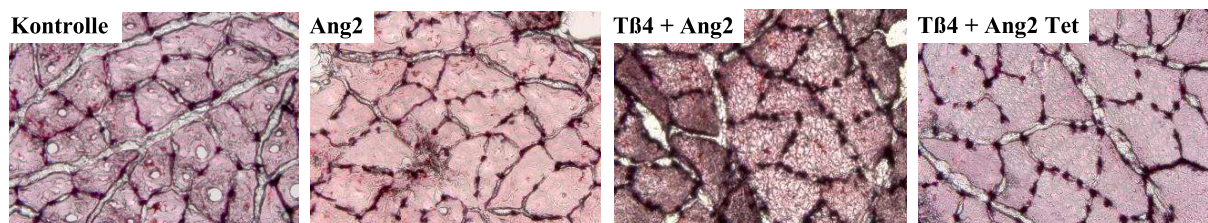


Abb. 23: Exemplarische AP-Färbungen der Kontrollgruppe sowie Ang2-, T β 4+Ang2-, T β 4+Ang2-Tet-Gruppen. Die Kapillaren sind schwarz gefärbt.

3.3.2 Kapillarreifung

Nur die Tβ4-Therapie ($0,51 \pm 0,03$) bewirkt eine signifikant bessere kapilläre Perizytenanlagerung gegenüber der Kontrollgruppe ($0,33 \pm 0,02$). Die Therapie mit Ang2 ($0,39 \pm 0,02$), Tβ4+Ang2 ($0,39 \pm 0,01$) und Tβ4+Ang2-Tet ($0,41 \pm 0,04$) erreicht keine signifikante Verbesserung. Der Unterschied von der Tβ4-Therapie zu Ang2 sowie Tβ4+Ang2 ist signifikant, zwischen Tβ4 und Tβ4+Ang2-Tet wird keine Signifikanz erreicht (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$ zur Kontrolle).

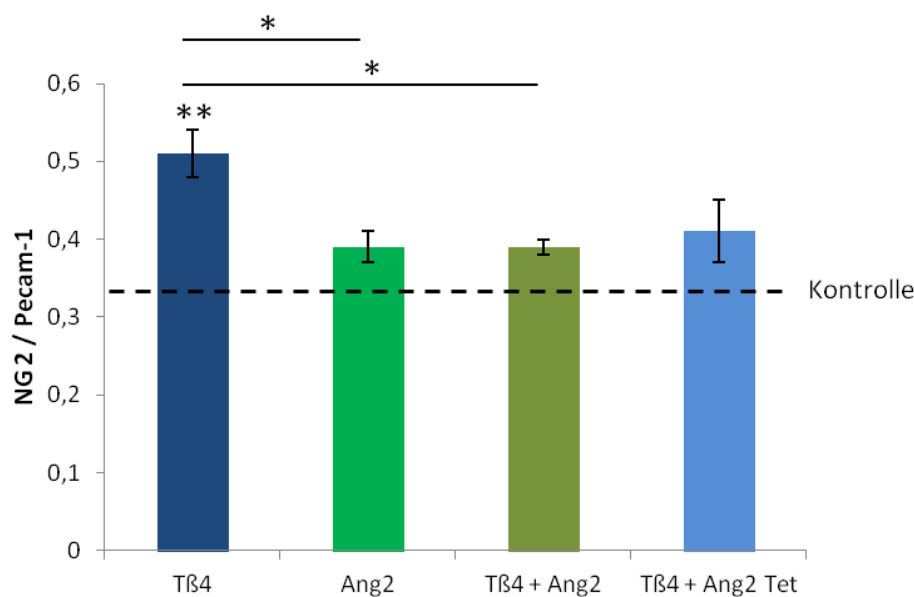


Abb. 24: Die Maturation der Kapillaren anhand des Verhältnisses von Perizyten (NG2) zu Kapillaren (Pecam-1) an Tag 35. Tβ4 bewirkt als einzige Therapie eine signifikant bessere Perizytenanlagerung gegenüber der Kontrollgruppe, auch der Unterschied zu Ang2 und Tβ4+Ang2 ist signifikant, nicht jedoch zu Tβ4+Ang2Tet. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$ zur Kontrolle.

3.3.3 Kollateralenwachstum

Die mit Ang2 therapierte Gruppe hat mit nur 93% der Kollateralen ($93,57\% \pm 5,12$) von Tag 7 die geringste Anzahl aller Vergleichsgruppen. Dagegen liegt die T β 4+Ang2-Gruppe mit $102,3\% \pm 5,66$ auf dem Niveau der Kontrollgruppe ($103,69\% \pm 5,68$) und die T β 4+Ang2-Tet-Gruppe etwas darüber ($115,77\% \pm 4,54$). Die Zunahme in der T β 4-Gruppe ($150,72 \pm 1,66$) ist signifikant höher als in allen Vergleichsgruppen. Unter den weiteren Vergleichsgruppen sind die Unterschiede nicht signifikant (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

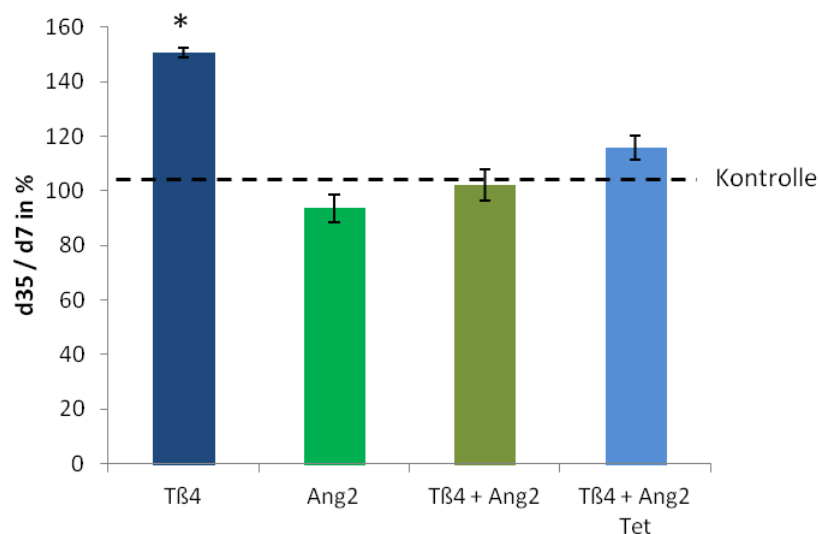


Abb. 25: Anzahl der Kollateralen an Tag 35 in % von Tag 7. Die Anzahl der Kollateralen ist in der T β 4-Gruppe signifikant höher als in allen Vergleichsgruppen. Die Ang2-Vergleichsgruppen liegen im Bereich der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen diesen Vergleichsgruppen ist nicht signifikant. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

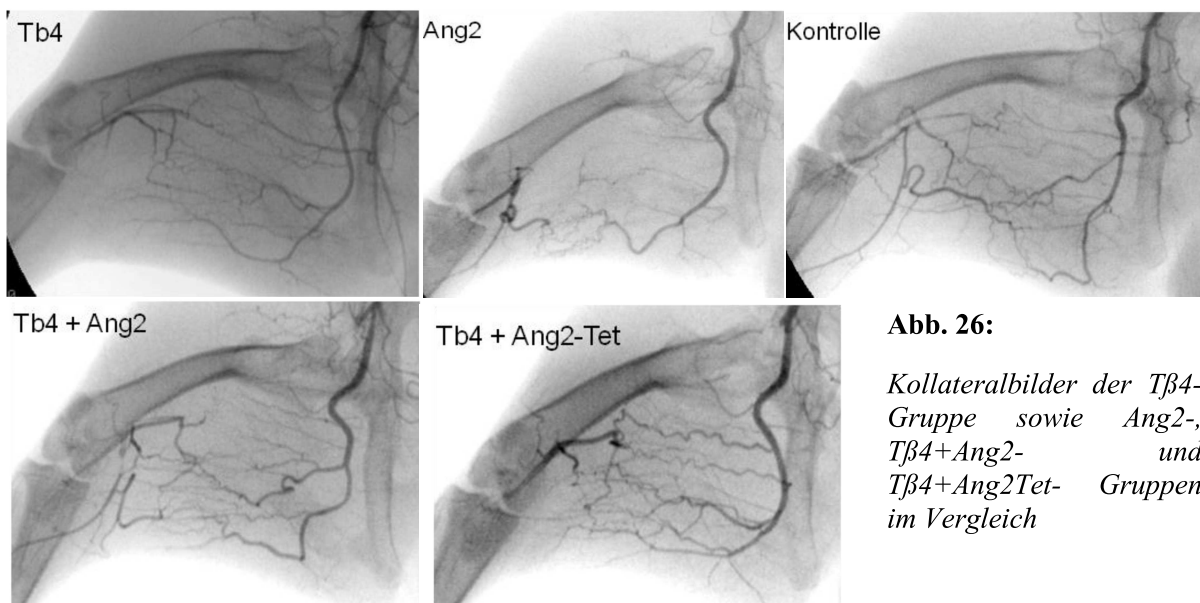


Abb. 26: Kollateralbilder der T β 4-Gruppe sowie Ang2-, T β 4+Ang2- und T β 4+Ang2Tet-Gruppen im Vergleich

3.3.4 Analyse der Blutflussgeschwindigkeit

In der Cinedensitometrie zeigt die Ang2-Gruppe mit $129,66\% \pm 10,19$ Blutflussgeschwindigkeit gegenüber Tag 7 die geringste Verbesserung der Vergleichsgruppen, der Unterschied zur Kontrollgruppe mit $108,13\% \pm 11,73$ ist nicht signifikant. Tß4+Ang2 zeigt mit $142,61\% \pm 4,94$ eine stärkere Zunahme der Flussgeschwindigkeit, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Tß4+Ang2-Tet ($179,73\% \pm 8,23$) und Tß4 ($187\% \pm 7,46$) zeigen eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe und der Ang2-Gruppe (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,01$ zur Kontrollgruppe, ** $p < 0,05$).

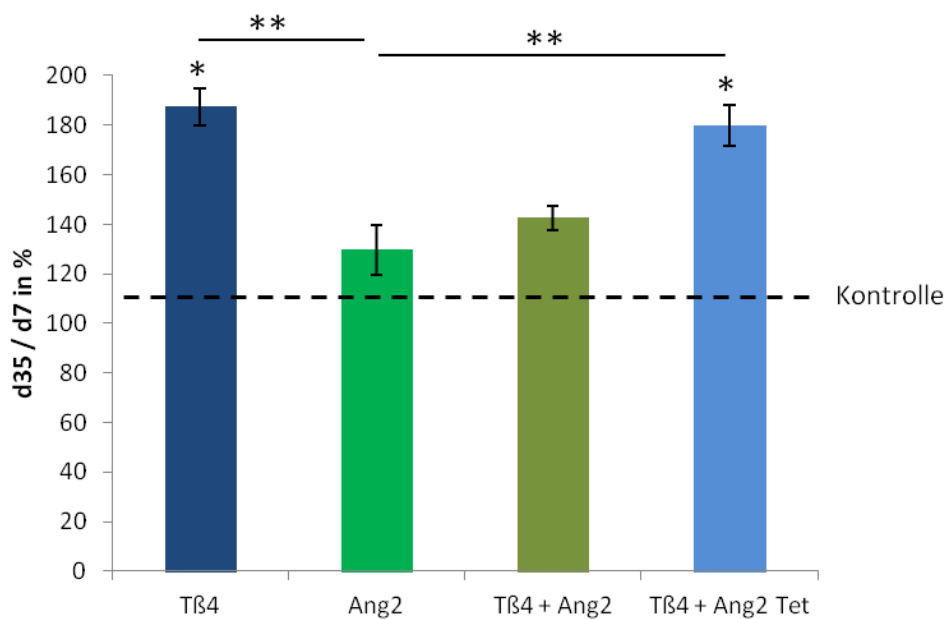


Abb. 27: Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit von Tag 7 zu Tag 35 in %: Die Blutflussgeschwindigkeit nimmt in der Tß4-Gruppe am meisten zu, knapp gefolgt von der Tß4+Ang2Tet-Gruppe. Die Ang2- und Tß4+Ang2-Gruppen verzeichnen eine deutlich geringere Geschwindigkeitszunahme. Tß4 und Tß4+Ang2-Tet zeigen eine signifikant höhere Zunahme als die Kontroll- und Ang2-Gruppe. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,01$ zur Kontrollgruppe, ** $p < 0,05$.

3.3.5 Analyse der Perfusion

In der Auswertung der Mikrosphären zeigt die Tß4-Gruppe mit $144,67\% \pm 4,99$ die beste Gewebepfusion mit einem signifikanten Unterschied zu allen Vergleichsgruppen. Die Kontrollgruppe ($109,23\% \pm 3,57$) sowie eine Therapie mit Ang2 ($119,18\% \pm 8,84$), Tß4 + Ang2 ($111,13\% \pm 4,03$) oder Tß4 + Ang2Tet ($119,0\% \pm 6,25$) zeigten keinen signifikanten Unterschied untereinander (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

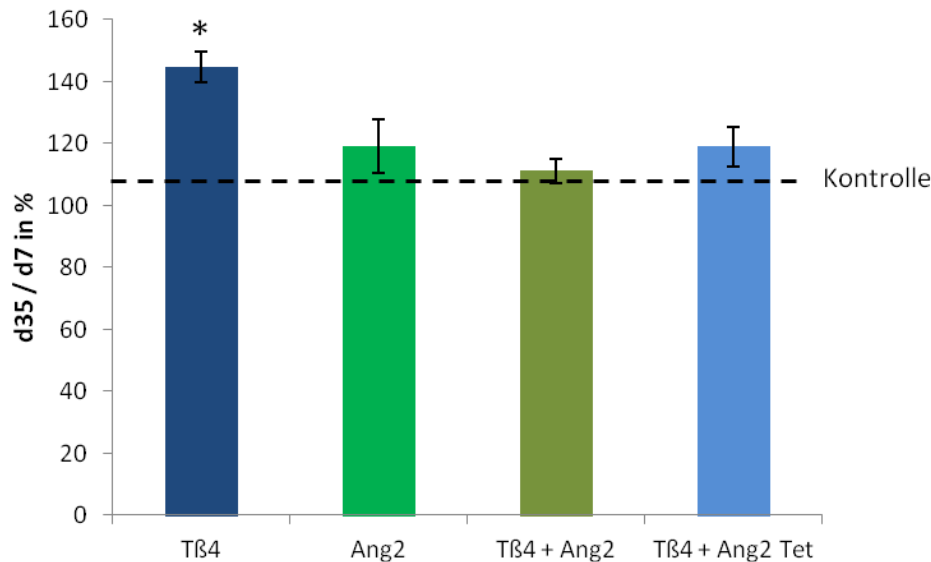


Abb. 28: Gewebepfusion von Tag 35 im Verhältnis zu Tag 7: Tß4 zeigt eine signifikant bessere Perfusion als die Kontrollgruppe. Ang2, Tß4+Ang2 oder Tß4+Ang2-Tet weisen untereinander keinen signifikanten Unterschied auf. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

3.4 Funktioneller Effekt von L-NAME

N_{ω} -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), ein L-Arginin-Analogon, ist ein reversibler, nicht-selektiver NOS-Inhibitor^{163,164}, der die Bildung von NO kompetitiv verhindert. Um die NO-Bildung zu unterdrücken, bekamen die Tiere ab Tag 7 täglich L-NAME p.o. mit dem Trinkwasser verabreicht. Durch Unterdrückung von NO sollte dessen Funktion auf Gefäßreifung und Kollateralisierung untersucht werden.

3.4.1 Kapillarwachstum

Die Anzahl der Kapillaren in der Tß4 + L-NAME-Gruppe ($1,92 \pm 0,13$) liegt nur gering niedriger als in der Tß4-Gruppe ($2,08 \pm 0,16$). Beide Gruppen zeigen eine signifikant bessere Kapillarisation als die Kontrollgruppe ($1,35 \pm 0,14$) (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

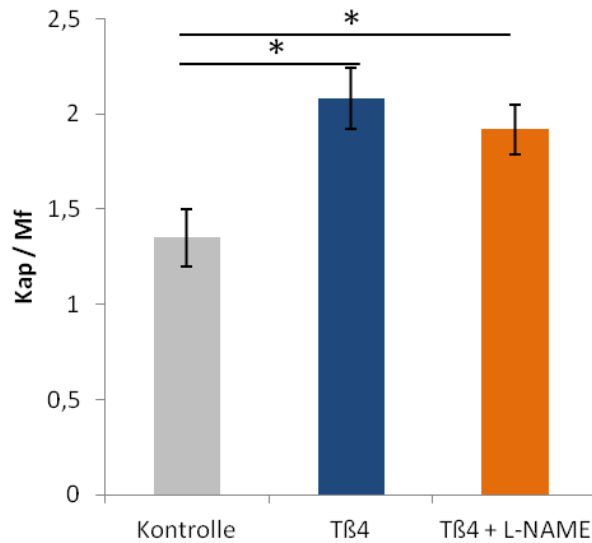


Abb. 29: Der Kapillaren-/Muskelfaser-Quotient ist in der Tβ4-Gruppe am höchsten ($2,08 \pm 0,16$), gefolgt von Tβ4 + L-NAME ($1,92 \pm 0,13$). Die Kontrollgruppe hat $1,35 \pm 0,14$ Kapillaren pro Muskelfaser. Der Unterschied sowohl von der Tβ4-Gruppe als auch von der Tβ4 + L-NAME-Gruppe zur Kontrollgruppe ist signifikant. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

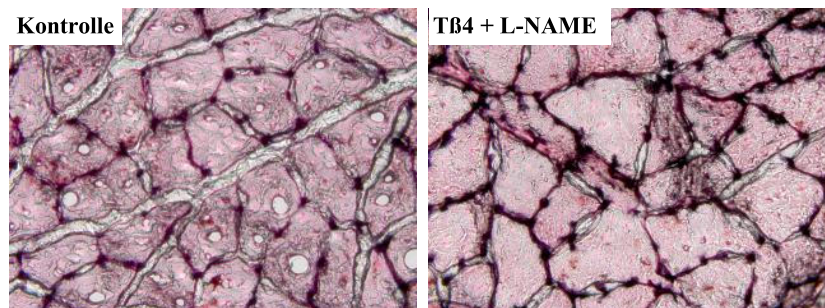


Abb. 30: AP-Färbungen zur Veranschaulichung der jeweiligen Kapillardichte

3.4.2 Kapillarreifung

Sowohl die Tβ4-Gruppe ($0,51 \pm 0,03$) als auch die Tβ4 + L-NAME-Gruppe ($0,45 \pm 0,02$) zeigen eine signifikant stärkere Perizytenanlagerung pro Kapillare im Unterschenkel als die Kontrollgruppe ($0,31 \pm 0,02$) (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

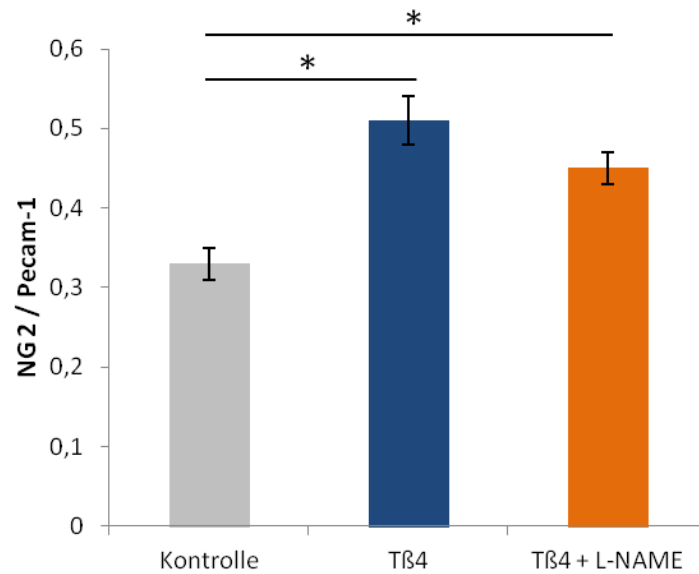


Abb. 31: Perizyten pro Kapillare als Indikator für die Gefäßmaturation. Sowohl Tβ4 als auch Tβ4 + L-NAME zeigen eine signifikant bessere Perizytenanlagerung als die Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

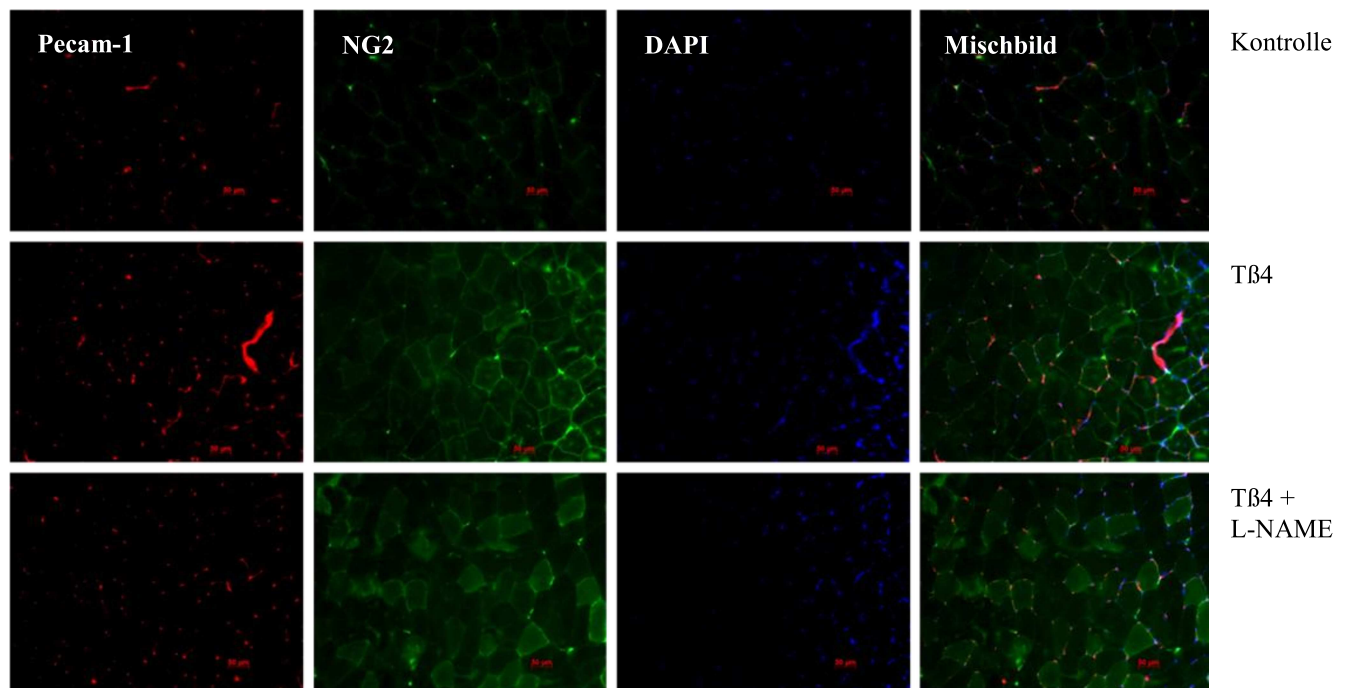


Abb. 32: Beispielhafte Immunfluoreszenz-Bilder der Tβ4, Tβ4 + L-NAME und Kontrollgruppe. Man sieht sowohl mehr Pecam-1 gefärbte Kapillaren als auch mehr NG2-gefärbte Perizyten in den Bildern der Tβ4- und Tβ4 + L-NAME-Gruppen.

3.4.3 Kollateralenwachstum

Die Anzahl der Kollateralen in der Tß4-Gruppe ($172,58 \pm 13,05$) ist signifikant höher als in der Tß4 + L-NAME- ($126,8 \pm 7,88$) und Kontrollgruppe ($103,69 \pm 5,68$). Der Unterschied zwischen den zwei letzteren ist nicht signifikant (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

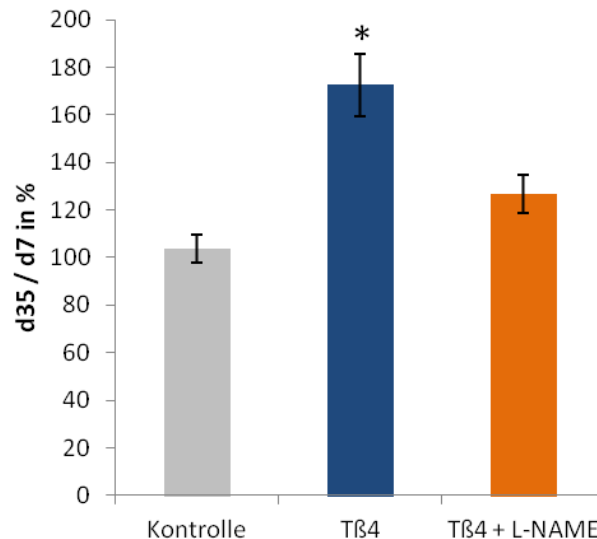


Abb. 33: Die Tß4-Therapie bewirkt die Bildung von signifikant mehr Kollateralgefäßen als die Tß4+L-NAME-Therapie oder in der Kontrollgruppe. Zwischen den beiden letzteren gibt es keinen signifikanten Unterschied. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

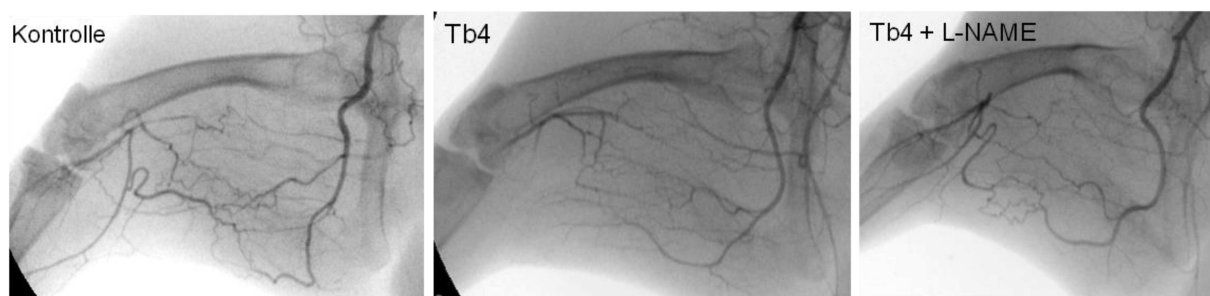


Abb. 34: CT-Angiographie-Bilder des Kollateralenwachstums der Vergleichsgruppen.

3.4.4 Analyse der Blutflussgeschwindigkeit

Die Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit von Tag 7 zu Tag 35 ist sowohl bei der Tß4 + L-NAME-Gruppe mit $140,28\% \pm 6,98$ als auch in der Kontrollgruppe ($108,13 \pm 11,73$) signifikant niedriger als bei der Tß4-Gruppe ($187,49\% \pm 7,46$). Tß4 + L-NAME zeigt ein besseres Ergebnis als die Kontrollgruppe, ohne jedoch eine Signifikanz zu erreichen (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

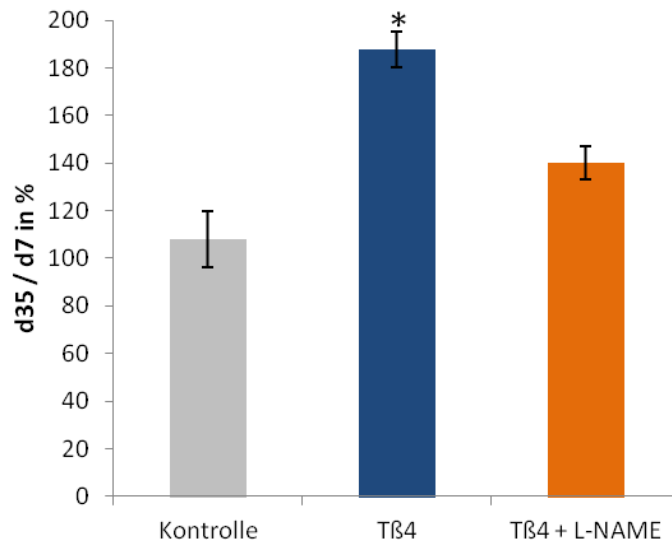


Abb. 35: Die Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit von Tag 7 zu Tag 35 in den Vergleichsgruppen: Tß4 bewirkt ein signifikant besseres Ergebnis als Tß4 + L-NAME und die Kontrollgruppe. Zwischen den letzten beiden besteht kein signifikanter Unterschied. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

3.4.5 Analyse der Perfusion

In der peripheren Perfusion zeigt die Tß4 + L-NAME-Gruppe mit $122,71\% \pm 5,1$ eine geringfügig bessere Wirkung als die Kontrollgruppe ($109,23\% \pm 3,57$). Beide Gruppen sind signifikant schlechter als die Tß4-Gruppe ($144,67\% \pm 4,99$) (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$).

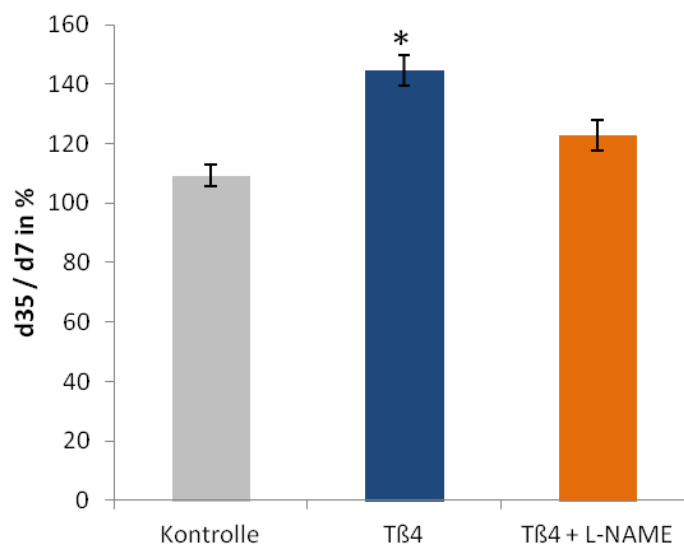


Abb. 36: Gewebeperfusion von Tag 35 im Verhältnis zu Tag 7: Tß4 + L-NAME zeigt ein geringfügig besseres Ergebnis als die Kontrollgruppe. Beide Gruppen sind in der Perfusionssteigerung signifikant schlechter als Tß4. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Rekombinante Adeno-assoziierte Viren als effiziente und sichere Vektoren

In der Gentherapie gilt es, einen Vektor zu finden, der dem Ideal – hohe Transfektionseffizienz, lange Expressionsdauer, keine Immunogenität, starker gewebespezifischer Tropismus, große Kapazität – möglichst nahe kommt. Unter den zahlreichen zur Verfügung stehenden Vektoren (nackte Plasmid-DNA, Retroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren) scheinen die AAVs derzeit den besten Kompromiss zwischen den oben genannten gewünschten Eigenschaften zu bieten. Unsere Arbeitsgruppe besitzt mehrjährige Erfahrung in der Herstellung und Arbeit mit AAVs^{73,140,165,166}. Durch quantitative Echtzeit-PCR und β -Galaktosidase-Färbung konnten wir nachweisen, dass die verwendeten rAAVs 2/9 ihr Zielgen (T β 4 und Ang2) gezielt und gewebespezifisch transkribieren (Siehe Kapitel 3.1). So war das Zielgen (Ang2) an den Unterschenkelmuskeln bis zu 3-fach erhöht gegenüber der Gegenseite, im Oberschenkel entsprach die Expression der eines Kontrolltieres.

AAVs zeichnen sich bei Gentherapien am Menschen durch ihre geringe Immunogenität sowie ihre lange und robuste Expression aus. Jedoch muss in Betracht gezogen werden, dass über 50% aller Menschen eine unterschiedlich hohe Konzentration an neutralisierenden Antikörpern gegen Wildtyp-AAV haben¹⁶⁷, die eine klinische Therapie nutzlos machen. Daher werden verschiedene Möglichkeiten erforscht, um diese Antikörper zu umgehen: So wurde eine wiederholte Virusapplikation diskutiert, die aufgrund der geringen Immunogenität ohne Folgen bleiben sollte. Doch sowohl präklinische als auch klinische Studien haben gezeigt, dass schon geringe Titer neutralisierender Antikörper die Therapie stark beeinträchtigen können¹⁶⁸. Eine andere Möglichkeit ist das AAV-Shuffling, bei dem der Kern eines AAV-Serotypen mit dem Kapsid eines anderen Serotypen kombiniert wird. Dies bringt noch andere Vorteile mit sich, wie zum Beispiel einen starken gewebespezifischen Tropismus bei AAV 2/9. Doch auch gegen AAV 9 besitzen 33% der Bevölkerung Antikörper¹⁶⁹. Eine neue Methode, um AAV-Antikörper zu umgehen, wurde kürzlich von György et al. vorgestellt: An extrazelluläre Vesikel gebundene AAV 9 (ev-AAV9) wurden signifikant weniger von neutralisierenden Antikörpern eliminiert als Standard-Vektoren, außerdem wiesen sie eine höhere Transfektionsrate auf¹⁶⁸. Dennoch zeigten in der Vergangenheit schon viele Methoden vielversprechende Ergebnisse im Labor, ohne dass diese in klinischen Studien wiederholt werden konnten¹⁷⁰; auch ev-AAVs werden ihren Vorteil noch in klinischen Studien zeigen müssen.

Alle AAV-Serotypen zeigen einen mäßig bis stark ausgeprägten Tropismus zu Hepatozyten. Ein erhöhtes Risiko für HCC durch AAV wurde in Mausversuchen ausgeschlossen⁷². Bei einem Hämophilie-B- Patienten einer Phase-1-Studie kam es jedoch zu einem Anstieg von CD8⁺-T-Zellen, einhergehend mit einem zeitlich begrenzten Anstieg der Transaminasen, welcher in Tierversuchen noch nicht beschrieben wurde¹⁷¹. Seitdem werden verschiedene Methoden diskutiert, die eine zelluläre Immunantwort vermeiden, um eine AAV-vermittelte Gentherapie möglichst vielen Menschen zugänglich zu machen. Doch bisher zeigen diese Methoden wenig Potential für den klinischen Alltag¹⁷².

4.2 Das Tet-Off-System als kontrollierter Gen-Regulator

Mithilfe des Tet-Off-Systems konnten wir die Expression des nachgeschalteten Gens (Tß4 oder Ang2) reversibel unterdrücken. Seit der Erstbeschreibung des Tet-off-Systems durch Gossen und Bujard⁷⁵ wurde dieses System in zahlreichen Studien genutzt und seine Wirksamkeit belegt¹⁷³, so dass wir es nicht für notwendig erachteten, die Wirksamkeit der Tetracyclin-vermittelten Gen-Unterdrückung selbst nachzuweisen. Es ist jedoch eine Überlegung wert, das Ausmaß der Unterdrückung in unseren Versuchen durch Zellversuche oder vergleichende quantitative Echtzeit-PCR einer mit und einer ohne Doxycyclin behandelten Tet-Off-Gruppe zu bestimmen. Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass die Applikation von Doxycyclin beim lebenden Tier die größte Wirkung hat, wenn es mit dem Futter und nicht mit dem Trinkwasser verabreicht wird¹⁷⁴. Unter diesem Aspekt wäre eine zukünftige Anpassung der Doxycyclin-Gabe denkbar. Bei Menschen konnte nachgewiesen werden, dass nach einmaliger AAV-Applikation das Gen nach über 10 Jahren immer noch exprimiert wurde¹⁷⁵. Da durch Gentherapie bei pAVK die Angiogenese und Kollateralisierung nur für bestimmte Zeit angeregt werden soll, wäre evtl. ein Tet-On-Modell sinnvoll, bei dem die Genexpression nur während der Tetracyclin-Gabe stattfindet und bei deren Absetzen unterdrückt wird. In diesem Fall könnte das Tet-On-3G-System verwendet werden, eine verbesserte Version des Tet-On-Systems, welches schon auf eine 100-fach niedrigere Doxycyclin-Dosis sensitiv reagiert und siebenfach stärker ist als das ursprüngliche Tet-On-System¹⁷⁶.

4.3 Das Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie

Um die chronische Hinterlaufischämie zu untersuchen, ist das Kaninchenmodell in unserer Arbeitsgruppe schon seit Jahren etabliert und bewährt^{16,151,177}. Obwohl es gegenüber anderen Tiermodellen wie der Maus sowohl in Haltung, OP-Verfahren als auch Untersuchungsmethoden höhere Kosten verursacht und aufwendiger ist, hat es gegenüber diesen Vorteile: So kann man durch komplette Exzision der A. femoralis die Hinterlaufischämie effektiver induzieren als beispielsweise durch alleinige Ligatur der Arterie im Mausmodell. Kaninchen ertragen das Modell der Hinterlaufischämie vergleichsweise gut: Während bei Mäusen in einzelnen Fällen die Füße bei induzierter Hinterlaufischämie nekrotisieren, ist dies bei Kaninchen nicht der Fall – im Gegenteil, auch ohne Therapie erreichen sie eine zumindest ausreichende Kollaterisierung mit einer Wiederherstellung des maximalen Flussvolumens bis 40% des Ausgangswertes²⁹. Auch Untersuchungsmethoden wie die Angiographie und die Perfusionsmessung durch Mikrosphären-Applikation sind bei der Maus aufgrund der geringen Größe schwer durchzuführen. Während das Mausmodell eher als dynamisches Modell zur Untersuchung der Anpassungsreaktion dient, eignet sich das Kaninchenmodell für die Untersuchung der chronischen Ischämie. Die Anpassung des Kaninchens ist nach 7 Tagen abgeschlossen, danach findet ohne Intervention keine weitere Verbesserung der Situation statt (vgl. Abb. 15, 17, 25, 27, 33, 35). Dies bietet die Möglichkeit, ab Tag 7 die funktionellen Effekte einer Therapie zu untersuchen. Aufgrund der Distanz zwischen Ober- und Unterschenkel bietet sich das Kaninchenmodell an, um im Unterschenkel die Angiogenese zu untersuchen bei gleichzeitiger Analyse der nicht durch Hypoxie, sondern durch Schubspannung getriggerten Arteriogenese im Oberschenkel.

Die Kapillardichte wurde nach AP-Färbung der Muskelschnitte nach Ziada et al.¹⁵⁸ unter einem Auflicht-Mikroskop der Firma Zeiss untersucht. Dieses Verfahren zur Quantifizierung wurde 1988 von Brown et al. etabliert¹⁵⁹ und ergibt durch die hohe Anzahl an zufällig ausgezählten Schnittbildern pro Muskel (7) einen verlässlichen und gut vergleichbaren Durchschnittswert der tatsächlichen Kapillardichte im Muskel.

Das Verfahren zur Quantifizierung der Kapillarreife mittels Pecam-NG2-Immunfluoreszenzfärbung ist in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls schon seit einiger Zeit etabliert, jedoch primär bei der Auswertung von murinem Gewebe^{73,140,166}. Wir verwendeten einen primären Pecam1-Antikörper aus der Maus und einen sekundären Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege, um die Kapillaren darzustellen. Einen geeigneten NG2-Antikörper zur Darstellung der Perizyten zu finden gestaltete sich schwierig, da alle verfügbaren

primären Antikörper in Kaninchen gezüchtet werden und sich somit ein sekundärer Anti-Kaninchen-Antikörper verbietet. Wir umgingen das Problem durch fluoreszierendes Labeling der primären NG2-Antikörper. Dennoch ließ sich eine im Vergleich zu Pecam-1 recht hohe Hintergrundfluoreszenz nicht vermeiden (vgl. Abb. 9, 16, 32). Sollten in Zukunft geeignete primäre NG2-Antikörper verfügbar sein, welche nicht in Kaninchen gezüchtet werden, wäre dies sicherlich ein Ansatz um die Bildqualität zu verbessern. Die Muskelschnitte wurden anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und nach der oben beschriebenen, seit 1988 etablierten Methode von Brown et al.¹⁵⁹ ein Mittelwert für die Kapillar- und Perizytdichte errechnet.

Die Kollateralen wurden nach einem von Asahara und Witzenbichler in den 90er Jahren etablierten Verfahren^{152,153} gezählt. Aufgrund der Verwendung des gleichen Gittermusters für alle Bilder und der gleichen Einstellungen im C-Bogen ergab sich eine gute Wiederholbarkeit der Messergebnisse. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass durch einen unterschiedlichen Winkel des untersuchten Beines zur Durchleuchtungsebene sowohl die Beine als auch die Kollateralen in einigen Tieren kürzer erschienen und gegebenenfalls weniger Kollateralen gezählt wurden. Auch wurde bei einem elektrisch in der Höhe verstellbaren OP-Tisch und dem elektrisch in der Höhe verstellbaren C-Bogen noch kein Standard etabliert, um die Bilder aus der immer gleichen Entfernung des C-Bogens zum Tisch aufzunehmen. Dadurch ist ein kleiner Größenunterschied des Beines und der Kollateralen auf dem Bild nicht auszuschließen, was in Kombination mit dem standardisierten Gitter zu einer leichten Verzerrung der Kollateralendichte führen könnte. Angesichts der hohen Anzahl an Kollateralen und der großen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ist dieser Effekt vernachlässigbar, doch könnte man die Ergebnisse in Zukunft durch eine Standardisierung des C-Bogen-Tisch-Abstandes noch genauer erfassen. Mit dieser Methode lässt sich die Anzahl der Kollateralen zuverlässig erheben, doch fehlt bisher ein Parameter, um die tatsächliche Größe sowie das Gesamtvolumen der Kollateralen zu erfassen. So ist theoretisch denkbar, dass in einem Modell wenige große Kollateralen das Blut genauso gut transportieren wie zahlreiche kleinere in einem Vergleichsmodell. Dies kann jedoch bei der bisher etablierten und in dieser Arbeit angewandten Methode nicht berücksichtigt werden.

Die Geschwindigkeit des Blutflusses durch die Kollateralen wurde mittels Cinedensitometrie nach einem 1996 von Gibson et al. und Dorsaz et al. etablierten Verfahren^{154,155} ermittelt. Die Perfusion des Hinterlaufs wurde mit Hilfe von Mikrosphären analysiert, welche derzeit den Goldstandard der Gewebepfusionsmessung darstellen. Die Ergebnisse der zwei Methoden

waren kongruent, doch war die Zunahme der Flußgeschwindigkeit zum Teil höher als die durch Mikrosphären gemessene Perfusionssteigerung des Gewebes.

4.4 Intermittierende Thymosin-β4-Expression

Bekanntermaßen fördert Tβ4 sowohl Angiogenese als auch Arteriogenese^{104,106,107}. Vorarbeiten unserer Gruppe konnten zeigen, dass dies über den Tβ4-MRTF-SRF-CCN-Signalweg geschieht, wobei CCN1 Angiogenese vermittelt und CCN2 Maturation⁷³. Wir wollten herausfinden, ob sich die Ergebnisse der konstanten Tβ4-Überexpression auch wiederholen oder gar verbessern lassen, wenn Tβ4 nicht konstant, sondern nur im Intervall überexprimiert wird. Zugrunde lag die Überlegung, dass die konstante Tβ4-Therapie eventuell das Aussprossen und die Kapillarisierung durch eine frühzeitige Gefäßreifung vorschnell unterdrückt und dass durch eine intervallmäßige Überexpression eine stärkere Angiogenese zugelassen wird. Dazu nutzten wir ein Tet-off-System, bei dem man die Überexpression durch Gabe von Doxycyclin stoppen kann (vgl. Kapitel 2.1.5). Das mit dem Tet-off gekoppelte Zielgen (Tβ4) wurde mittels AAV intramuskulär in den Unterschenkel appliziert (vgl. Kapitel 2.2.4).

Es zeigte sich, dass das Kapillarwachstum gleich oder sogar leicht höher war als bei der Tβ4-Gruppe (vgl. Abb. 13). Dies spricht dafür, dass die Kapillarisierung in der Tat noch zu steigern ist, wenn man die durch Tβ4 induzierten Maturierungsprozesse etwas verzögern kann. Der Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen war jedoch nur marginal, sodass man zum derzeitigen Stand eine signifikante Steigerung der Angiogenese in Zweifel ziehen darf.

Andere untersuchte Parameter zeigten bei der Intervalltherapie eine reduzierte Wirksamkeit gegenüber der konstanten Überexpression: So war in der Gefäßmaturation, dargestellt durch die Anzahl an Perizyten pro Kapillare, eine signifikante Verbesserung durch konstante Tβ4-Überexpression feststellbar, die Intervalltherapie bewirkte hingegen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Auch die Differenz zwischen den Tβ4-Vergleichsgruppen war nicht signifikant (vgl. Abb. 15). Dies zeigt die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Stimulus auf die Kapillaren, um robuste und stabile Gefäße zu bilden. Analog der Gefäßmaturation bewirkte eine kontinuierliche Tβ4-Therapie eine signifikant bessere Gewebepfusion des Unterschenkels gegenüber der Kontrollgruppe. Eine intermittierende Tβ4-Therapie führte zu einer verbesserten Pfusion, doch war der Unterschied weder zur Kontrollgruppe noch zur kontinuierlichen Therapie signifikant (vgl. Abb. 20).

Die Anzahl der Kollateralen zeigte einen deutlicheren Unterschied: Die kontinuierliche Tß4-Überexpression bewirkte eine signifikante Zunahme an Kollateralen gegenüber der Kontroll- und Vergleichsgruppe (Tß4 intermittierend). Die intermittierende Therapie führte zu keiner signifikanten Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 17). Dagegen war die Flussgeschwindigkeit durch die Kollateralen in beiden Tß4-Therapien gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht, der Unterschied von der kontinuierlichen zur intermittierenden Therapie war nur gering (vgl. Abb. 19). Dies ist kongruent mit der Tatsache, dass wenige große Kollateralen Blut effizienter transportieren können als viele kleine (vgl. Kapitel 1.2.3). Es überrascht jedoch insofern, als die kontinuierliche Tß4-Überexpression sowohl die Anzahl der Kollateralen als auch die Flussgeschwindigkeit gegenüber der Kontrollgruppe signifikant steigern konnte. Die intermittierende Therapie bewirkte bei geringerer Perfusion im Endstromgebiet und signifikant geringerer Anzahl an Kollateralen fast die gleiche Zunahme an Flussgeschwindigkeit. Dies ließe sich durch Reifung weniger besonders leistungsfähiger und kräftiger Kollateralen erklären (siehe dazu auch Abb. 18).

Angesichts der geringeren Wirkung von Tß4 in der intermittierenden Therapie mit Doxycyclin auf Kapillarreifung und Gewebepfusion wäre eine mögliche Überlegung für weitere Untersuchungen, das Intervall zu verändern. So wurde in diesem Fall Tß4 für nur zwei Tage überexprimiert, gefolgt von einer fünftägigen Blockade. Anders et al. konnten 2012 nachweisen, dass Doxycyclin eine Depotbildung aufweist, die erst langsam nachlässt¹⁷⁸. Dies könnte eine Erklärung für das vergleichsweise schwache Ergebnis der intermittierenden Therapie sein: Nachdem die Tß4-Überexpression fünf Tage lang durch Doxycyclin unterdrückt wurde, konnte sie aufgrund des Doxycyclin-Depots innerhalb der folgenden zwei Tage nicht den gleichen Wirkspiegel erreichen wie im gleichen Zeitraum der kontinuierlichen Überexpression. Bei weiteren Versuchen könnte diese Betrachtung mit in das Studiendesign einfließen, z.B. durch eine längere Expressionszeit von Tß4. Die schon zuvor erwähnte Verwendung eines Tet-On-Systems brächte den weiteren Vorteil mit sich, dass nach Beendigung der Therapie durch Absetzen von Doxycyclin die von Anders et al. beschriebene Depotwirkung noch für begrenzte Zeit eine im Verlauf abnehmende Überexpression des Zielgens zur Folge hätte.

4.5 Tß4 + Ang2

Angiopoietin-2 bewirkt als Antagonist von Angiopoietin-1 eine Auflockerung der Gefäßwände, eine Loslösung von Perizyten und eine erhöhte Gefäßpermeabilität^{115,132-134}. Zugleich wirkt es in Gegenwart proangiogenetischer Faktoren selbst proangiogenetisch¹³⁶.

Nachdem sich zeigte, dass eine Tß4-Therapie im Intervall die funktionellen Effekte der Tß4-Dauertherapie auf Angiogenese zwar wiederholen, aber nicht verbessern und die Effekte auf Arteriogenese nicht wiederholen kann, wollten wir untersuchen, ob sich die Ergebnisse der Tß4-Dauertherapie verbessern lassen, indem man durch kurzzeitige, initiale Ang2-Überexpression mittels Auflockerung der perivaskulären Matrix die Aussprossung von Kapillaren erleichtert und somit die Angiogenese steigert. Da nach Gruchala et al. eine wirksame Expressionsrate ca. ab Tag 6 nach Applikation erreicht ist⁵², ließen wir eine gleichzeitige Ang2-Tet- und Tß4-Überexpression bis Tag 12 zu und gaben von Tag 13 bis Tag 35 Doxycyclin. Dadurch blieb die Tß4-Überexpression unberührt, wohingegen das Ang2-Tet-Gen nach 7 Tagen Überexpression supprimiert wurde. Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe nur mit Ang2 behandelt und eine weitere Kontrollgruppe mit Tß4 und Ang2 bis Tag 35 therapiert.

Die Angiogenese konnte durch eine zeitlich begrenzte Ang2-Koapplikation nicht gesteigert werden, im Gegenteil fiel sie geringer aus, wenn auch nicht signifikant (vgl. Abb. 22). Interessanterweise war die Angiogenese bei dauerhafter Koapplikation von Tß4 und Ang2 deutlich stärker als bei zeitlich begrenzter Koapplikation. Sie konnte zwar das Ergebnis alleiniger Tß4-Überexpression nicht verbessern, erreichte aber das gleiche Niveau. Alleinige Ang2-Überexpression bewirkte nur ein geringfügig stärkeres Kapillarwachstum als in der Kontrollgruppe. Dies bekräftigt die Beobachtung, dass Ang2 in Gegenwart proangiogenetischer Wachstumsfaktoren selbst proangiogenetisch wirkt, in deren Abwesenheit jedoch zu einem Rückgang der Angiogenese führt^{119,136,137}. Dass die Angiogenese durch Angiopoietin-2 nicht gesteigert werden konnte, sondern nur das gleiche Niveau wie Tß4 erreichte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass es Synergien in den Signalwegen der beiden Proteine gibt.

Die Wirkung von Tß4 auf die Gefäßmaturation wurde durch Ang2 vollständig aufgehoben: Die dauerhafte Koapplikation von Tß4 und Ang2 bewirkte eine Gefäßmaturation in dem gleichen Maße wie alleinige Ang2-Applikation und nur geringfügig stärker als in der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 24). Der Unterschied zu alleiniger Tß4-Überexpression war signifikant. Bei initialer Ang2-Koapplikation war ebenfalls eine geringere Dichte an Perizyten zu beobachten, jedoch nicht in gleichem Maße reduziert, sodass es gegenüber der Tß4-Therapie zu keinem signifikanten Rückgang an Perizytenanlagerung kam. Dies könnte der kürzeren Expressionszeit von Ang2 und seiner inflammatorischen Wirkung geschuldet sein.

Das Kollateralenwachstum war bei alleiniger Ang2-Überexpression geringer als in der Kontrollgruppe, eine Beobachtung, die schon Reiss et al. machten¹³⁹. Auch bei dauerhafter Koapplikation von Tß4 und Ang2 war die Anzahl der Kollateralen niedriger als in der Kontrollgruppe, wohingegen die initiale Ang2-Koapplikation geringfügig mehr Kollateralen bewirkte als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied zur Tß4-Therapie war in allen Varianten signifikant (vgl. Abb. 25), passend zu der blockierten Maturierung bei Koapplikation von Tß4 und Ang2. Dieser Effekt spiegelte sich in der Blutflussgeschwindigkeit der Kollateralen wider, welche bei alleiniger Ang2-Überexpression signifikant reduziert war und auch bei dauerhafter Koapplikation von Tß4 und Ang2 weit unter jener bei alleiniger Tß4-Überexpression blieb (vgl. Abb. 27). Eine Ausnahme bildete die Koapplikation von Tß4 mit nur initialer Ang2-Überexpression. Hier lag die Flussgeschwindigkeit signifikant über den Ang2-Vergleichsgruppen sowie der Kontrollgruppe und nur wenig hinter der Tß4-Therapie. Entsprechend waren die Kollateralen in der Tß4 + Ang2-Tet – Therapie trotz ihrer geringen Anzahl vergleichsweise robust und kräftig (vgl. Abb. 26). Obwohl die Flussgeschwindigkeit in beiden mit Tß4 und Ang2 therapierten Gruppen im Verhältnis zur Kontrollgruppe und auch der Ang2-Referenzgruppe höher war, als es die Maturierung und Gewebepерfusion vermuten ließen, so ist die Zunahme der Flussgeschwindigkeit in der Tß4+Ang2-Tet-Gruppe gegenüber der Tß4+Ang2-Gruppe doch erstaunlich.

Die Gewebepерfusion war in den Gruppen, welche ausschließlich oder teilweise mit Ang2 therapiert wurden, entsprechend der Reduzierung von Maturierung und Kollateralenwachstum nur schwach ausgeprägt und lag geringfügig über dem Niveau der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 28).

Reiss et al. konnten zeigen, dass unter anderem die Dosierung von Ang2 entscheidend für die Reperfusion nach einem Ischämieschaden ist¹³⁹. So war in einem Mausmodell mit Ang2-Überexpression der Blutfluss signifikant schlechter als in Wildtyp-Mäusen. In einem anderen Modell von Tressel et al. hingegen wurde die Arteriogenese durch Ang2-Inhibition geblockt, ein Umstand, der so gewertet wurde, dass Ang2 in einer physiologischen, transienten Hochregulierung stimulierend wirkt und in dieser Form für Arteriogenese essentiell ist, dass es aber in höheren Konzentrationen als der physiologischen Dosis oder auch bei längerer Expressionszeit eine chronische Inflammation hervorruft und mit Leckage und Gefäßrückbildung einhergeht¹⁷⁹. Es lässt sich festhalten, dass weder durch kontinuierliche noch ausschließlich initiale Ang2-Koapplikation eine Wirkungssteigerung auf Angiogenese

und Arteriogenese von Tß4 erreicht werden konnte; vielmehr wurde die Arteriogenese bei kontinuierlicher Ang2-Überexpression weitgehend inhibiert.

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich den therapeutischen Effekt von kontinuierlicher Ang1-Expression und initialer Ang2-Expression mit robuster Kapillarisierung und Maturation im murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell aufzeigen, welcher weder durch alleinige Applikation von Ang1 noch von Ang2 erreicht werden konnte¹⁴⁰. Brudno et al. wiesen nach, dass die zeitlich versetzte Applikation von Ang2 und Ang1 ebenfalls ein starkes Kapillarwachstum mit nicht inhibierter Maturation zur Folge hatte¹⁸⁰. Dies könnte zum Einen ein Hinweis dafür sein, dass Ang1 als starker Maturationsfaktor und Ang2-Antagonist mithilfe der aufgelockerten perivaskulären Matrix in stärkerem Maße stabile und reife Gefäße bilden kann als Tß4. Zum Anderen könnte es bedeuten, dass drei Tage Überexpression von Ang2 reichen, um eine starke Maturation zu gewährleisten, und dass die in unserer Studie angewandte Dauer von sieben Tagen zu lang ist.

4.6 Tß4+L-Name:

Tß4 wirkt über CCN1 und CCN2 auf Angiogenese und Arteriogenese⁷³. Die proangiogenetische Wirkung der Tß4-Applikation im Unterschenkel reicht aus, um im Oberschenkel das Wachstum funktionsfähiger Kollateralgefäße zu induzieren^{73,181} (vgl. Abb. 18). Durch die Bildung eines robusten Systems der Mikrozirkulation mit stabilen Kapillaren und Mikroarteriolen wird die Oberfläche des Endstromgebietes vergrößert. Der somit erhöhte Abstrom von Blut bewirkt an den vorangeschalteten arteriellen Gefäßen eine erhöhte Schubspannung, welche für die Arteriogenese essentiell ist²⁸. Durch Schubspannung wird aus aktivierten Endothelzellen NO freigesetzt^{32,33}, welches als essentieller Bestandteil über den NOS-Signalweg an der Arteriogenese beteiligt ist¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Wir stellten die Hypothese auf, dass das Kollateralenwachstum im Oberschenkel über einen NO-abhängigen Rückkopplungs-Mechanismus („*backward signalling*“) aus dem Unterschenkel vermittelt wird. Dies wollten wir mittels NO-Inhibition durch L-NAME, einem nicht-selektiven NOS-Inhibitor, bestätigen.

Die Ergebnisse unserer Versuche bekräftigten die Hypothese des „*backward signalling*“: Durch Ko-Applikation von L-NAME fiel die Kapillardichte im Unterschenkel im Vergleich zu einer konstanten Tß4-Überexpression etwas geringer aus, ohne dass der Unterschied signifikant wäre (vgl. Abb. 29). Auch die Gefäßmaturation wurde durch Ko-Applikation von L-NAME nur leicht reduziert, der Unterschied zur alleinigen Tß4-Therapie war nicht signifikant (vgl. Abb. 31). Dagegen waren sowohl die Anzahl der Kollateralen als auch die Flussgeschwindigkeit bei Ko-Applikation von L-NAME signifikant erniedrigt, die Werte

befanden sich nur knapp über der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 33, 35). Entsprechend der schlechten Kollateralisierung war auch die Gewebepfusion im Endstromgebiet signifikant reduziert gegenüber der T β 4-Therapie (vgl. Abb. 36). Durch Blockade des NO-Signalweges wurde also die durch T β 4 vermittelte Kollateralenbildung verhindert und damit einhergehend die Flussgeschwindigkeit in den Kollateralen sowie mangels ausreichender Blutversorgung die periphere Gewebepfusion signifikant begrenzt. Somit scheint der Signalweg, welcher zu einem Kollateralenwachstum führt, NO-abhängig zu sein.

Die Kollateralisierung wurde jedoch nicht vollständig aufgehoben, die Werte lagen dennoch etwas über denen der Kontrollgruppe. Lohr et al. konnten kürzlich durch Infrarotlicht-Versuche nachweisen, dass NO nicht ausschließlich von NOS synthetisiert, sondern noch über andere Mechanismen bereitgestellt wird¹⁸². Dies könnte erklären, dass bei L-NAME-Therapie trotz der NOS-Inaktivierung Kollateralisierung, Blutflussgeschwindigkeit und Gewebepfusion zwar signifikant schlechter waren als bei der T β 4-Therapie, jedoch nicht komplett supprimiert wurden und auf das Niveau der Kontrollgruppe sanken. Die Ergebnisse sind aussagekräftig in der Bestätigung der Hypothese des NO-Rückkopplungs-Mechanismus⁴.

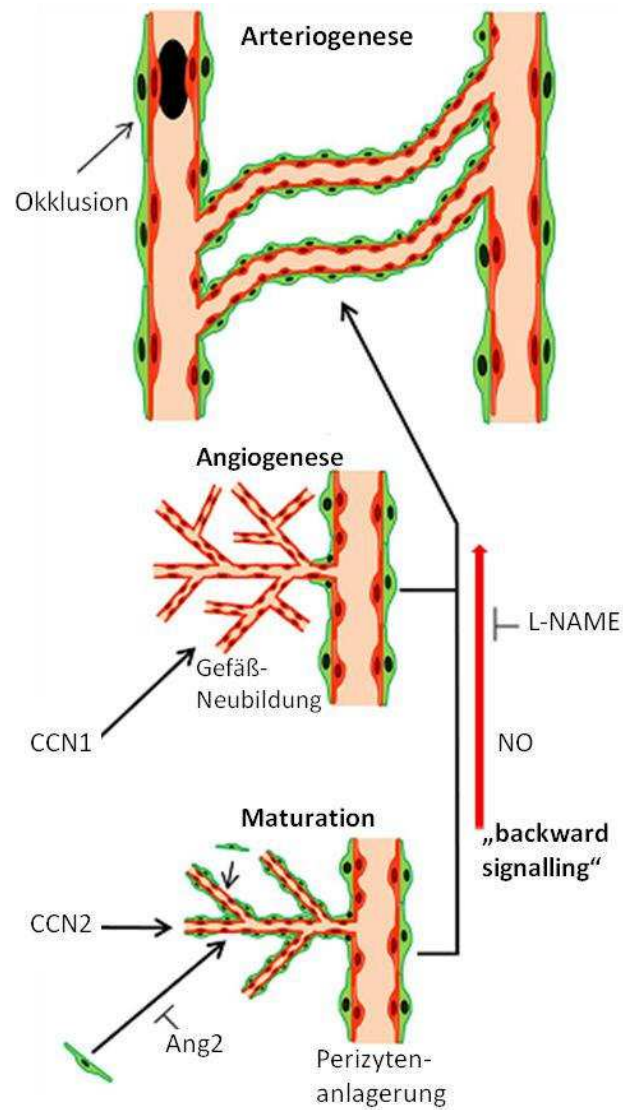


Abb. 37: *Tβ4* vermittelt über *CCN1* Angiogenese und über *CCN2* Gefäßmaturation durch Stabilisierung der Zellwände, u.a. mittels Perizytenanlagerung. Die Perizytenanlagerung kann durch *Ang2* abrogiert werden. In den vorangehenden Arteriolen wird durch den zusätzlichen Abstrom eine Schubspannung erzeugt, welche wiederum die Freisetzung von NO aus den Endothelzellen bewirkt. Über einen NO-vermittelten Signalweg kommt es zu einer Ausbildung von Kollateralen im Oberschenkel. Dieser Signalweg kann durch L-NAME, einem NOS-Inhibitor, blockiert werden [nach Hinkel et al., 2014].

5 Zusammenfassung

Atherosklerose und pAVK sind Krankheitsbilder, die besonders in Industriestaaten immer mehr Menschen betreffen und für welche die Behandlungsmethoden bei einem zunehmenden Anteil von Patienten ausgeschöpft sind. Ein Forschungsfokus liegt aufgrund der geringen Invasivität und der vielen Möglichkeiten seit einiger Zeit verstärkt auf der Gentherapie. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe stellte sich Thymosin- β 4 als vielversprechendes Protein heraus, das über den T β 4-MRTF-SRF-CCN-Signalweg sowohl Angiogenese als auch Maturation und Kollateralisierung fördert.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, ob durch eine Veränderung der T β 4-Therapie, entweder durch Überexpression im Intervall oder durch Ko-Applikation von Ang2, die funktionellen Ergebnisse wiederholt oder verbessert werden können.

Die T β 4-Überexpression wurde im Intervall durch ein Tet-off-System mittels Doxycyclin unterdrückt. Es zeigte sich, dass das Kapillarwachstum bei der Expression im Intervall in der Tat geringfügig stärker ist als bei konstanter T β 4-Expression. Jedoch war diese Zunahme insignifikant und verbesserte weder die nachfolgende Maturation der Gefäße noch die Hinterlaufperfusion, im Gegenteil, beide Parameter fielen geringer aus als bei konstanter Expression.

Anschließend wurde untersucht, ob sich bei Ko-Applikation von T β 4 und Ang2 durch die initiale Wirkung von Ang2 auf extrazelluläre Matrix und Gefäßwanddicke die Kapillarisierung und anschließende Gefäßreifung verbessern lassen. Dabei stellte sich heraus, dass alle untersuchten Parameter nicht zu- sondern abnahmen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse einer kontinuierlichen T β 4-Überexpression weder durch eine Intervalltherapie noch durch kombinierte T β 4- und Ang2-Applikation mit den von uns gewählten Parametern verbessert werden können.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob das Kollateralenwachstum von der NO-Rückkopplung aus dem Endstromgebiet abhängig ist. Dazu wurde L-NAME, ein nicht-selektiver NOS-Inhibitor, für die Dauer der Therapie verabreicht. In der Tat war die Kollateralisierung und damit einhergehend die Flussgeschwindigkeit sowie die Gewebeperfusion signifikant erniedrigt, wohingegen die unabhängig vom *NOS-pathway* funktionierende Angiogenese und Maturierung nicht signifikant verändert waren. Diese

Ergebnisse bekräftigen die Hypothese des NO-abhängigen Rückkopplungsmechanismus zwischen Angiogenese und Maturierung im Endstromgebiet und proximal davon stattfindender Kollateralisierung.

6 Abkürzungsverzeichnis

A. femoralis	Arteria femoralis
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ABIN-2	A20 Binding Inhibitor of NFκB 2
AD	M. adductor magnus
AKT	Proteinkinase B
Ang	Angiopoietin
AP	Alkalische Phosphatase
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Komplementäre DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dsDNA	Doppelstrang DNA
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
FIB	M. fibularis
FKHR	Forkhead Transcription Factor
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GC	M. gastrocnemius
GPC1	Glypican-1
h	Stunde
HCC	Leberzellkarzinom
HIF-1α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1α
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM 1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukin

Kap	Kapillaren
kDa	Kilo Dalton
Lig. inguinale	Ligamentum inguinale
LPS	Lipopolysaccharid
LYL 1	Protein „LYL 1“
M	mol/l
M. tibialis anterior	Musculus tibialis anterior
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MF	Muskelfaser
min	Minute
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ml	Milliliter
MRTF	Myocardin Related Transcription Factor
N. ischiadicus	Nervus ischiadicus
NFκB	Nuclear Factor „Kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NFW	Nuclease Free Water
nm	Nanometer
NO	Nitric oxide / Stickstoffmonoxid
NOS	Nitric Oxid Synthase
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Salzsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMN	Polymorphonukleäre Neutrophile Leukozyten
rAAV	Rekombinanter AAV
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
rt-PCR	Echtzeit-PCR

SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SRF	Serum Response Factor
ssDNA	Einzelstrang DNA
TA	M. tibialis anterior
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TIVA	Total Intravenöse Anästhesie
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
V. femoralis	Vena femoralis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VM	M. Vastus medialis

7 Literaturverzeichnis

1. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*. Mar 21 2006;113(11):e463-654.
2. Huppert P, Tacke J, Lawall H, Gefäßmedizin DGfA. [S3 guidelines for diagnostics and treatment of peripheral arterial occlusive disease]. *Der Radiologe*. Jan 2010;50(1):7-15.
3. Espinola-Klein C, Savvidis S. [Peripheral arterial disease: epidemiology, symptoms and diagnosis]. *Der Internist*. Aug 2009;50(8):919-926.
4. Kröger K, Stang A, Kondratieva J, et al. Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf recall study. *European journal of epidemiology*. 2006;21(4):279-285.
5. Prompers L, Huijberts M, Schaper N, et al. Resource utilisation and costs associated with the treatment of diabetic foot ulcers. Prospective data from the Eurodiale Study. *Diabetologia*. Oct 2008;51(10):1826-1834.
6. Espinola-Klein C. [Peripheral arterial disease]. *Der Internist*. May 2011;52(5):549-560; quiz 561.
7. Lawall H, Rümenapf G. Therapie der PAVK. *VASA. Zeitschrift für Gefasskrankheiten*. 2009;38(75 / 2009):23-25.
8. Money SR, Herd JA, Isaacsohn JL, et al. Effect of cilostazol on walking distances in patients with intermittent claudication caused by peripheral vascular disease. *Journal of vascular surgery*. Feb 1998;27(2):267-274; discussion 274-265.
9. Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR, et al. A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *The American journal of medicine*. Nov 2000;109(7):523-530.
10. Schulte KL. [Peripheral arterial disease: secondary prevention, medical therapy, revascularization]. *Der Internist*. Aug 2009;50(8):927-935.
11. Varu VN, Hogg ME, Kibbe MR. Critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery*. Jan 2010;51(1):230-241.
12. Goodney PP, Likosky DS, Cronenwett JL, Vascular Study Group of Northern New E. Predicting ambulation status one year after lower extremity bypass. *Journal of vascular surgery*. Jun 2009;49(6):1431-1439 e1431.

13. Davies MG. Critical limb ischemia: introduction. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*. Oct-Dec 2012;8(4):2.
14. Davies MG. Critical limb ischemia: cell and molecular therapies for limb salvage. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*. Oct-Dec 2012;8(4):20-27.
15. Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. *Circulation research*. Mar 13 2009;104(5):576-588.
16. Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, et al. Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Sep 2005;19(11):1576-1578.
17. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. Jan 13 2006;124(1):175-189.
18. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Jul 1 2003;23(7):1143-1151.
19. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. Apr 2000;6(4):389-395.
20. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. Sep 16 2011;146(6):873-887.
21. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell*. Feb 2009;16(2):196-208.
22. Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*. Oct 2010;22(5):617-625.
23. De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. May 2009;29(5):639-649.
24. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Experimental cell research*. Mar 10 2006;312(5):623-629.
25. Kupatt C, Hinkel R, Pfosser A, et al. Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *Journal of the American College of Cardiology*. Jul 27 2010;56(5):414-422.
26. Pirot N, Deleuze V, El-Hajj R, et al. LYL1 activity is required for the maturation of newly formed blood vessels in adulthood. *Blood*. Jun 24 2010;115(25):5270-5279.
27. Herzog S, Sager H, Khmelevski E, Deylig A, Ito WD. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. Nov 2002;283(5):H2012-2020.

28. Heil M, Schaper W. Insights into pathways of arteriogenesis. *Current pharmaceutical biotechnology*. Feb 2007;8(1):35-42.
29. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circulation research*. Jun 1997;80(6):829-837.
30. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. Dec 2002;283(6):H2411-2419.
31. Hellingman AA, Zwaginga JJ, van Beem RT, et al. T-cell-pre-stimulated monocytes promote neovascularisation in a murine hind limb ischaemia model. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. Mar 2011;41(3):418-428.
32. Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atherosclerosis. Supplements*. Dec 2003;4(4):53-60.
33. Schaper W. Collateral circulation: past and present. *Basic research in cardiology*. Jan 2009;104(1):5-21.
34. Geary RL, Kohler TR, Vergel S, Kirkman TR, Clowes AW. Time course of flow-induced smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in endothelialized baboon vascular grafts. *Circulation research*. Jan 1994;74(1):14-23.
35. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation research*. Nov 1996;79(5):911-919.
36. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *The Journal of clinical investigation*. Feb 1994;93(2):662-670.
37. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*. Dec 15 1996;94(12):3281-3290.
38. Harada K, Friedman M, Lopez JJ, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *The American journal of physiology*. May 1996;270(5 Pt 2):H1791-1802.
39. Buschmann IR, Hoefer IE, van Royen N, et al. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. Dec 2001;159(2):343-356.
40. Simons M, Annex BH, Laham RJ, et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*. Feb 19 2002;105(7):788-793.
41. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*. Mar 18 2003;107(10):1359-1365.

42. van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, et al. START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation*. Aug 16 2005;112(7):1040-1046.
43. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circulation research*. Feb 17 2012;110(4):624-637.
44. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation research*. Sep 30 2011;109(8):923-940.
45. Stachel G, Trenkwalder T, Gotz F, et al. SDF-1 fused to a fractalkine stalk and a GPI anchor enables functional neovascularization. *Stem cells*. Sep 2013;31(9):1795-1805.
46. Hinkel R, Bock-Marquette I, Hatzopoulos AK, Kupatt C. Thymosin beta4: a key factor for protective effects of eEPCs in acute and chronic ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Apr 2010;1194:105-111.
47. Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, et al. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation*. May 28 2002;105(21):2556-2561.
48. Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, et al. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic acids research*. 2004;32(20):e159.
49. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, et al. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation*. Feb 3 2004;109(4):526-531.
50. Mali S. Delivery systems for gene therapy. *Indian journal of human genetics*. Jan 2013;19(1):3-8.
51. Hinkel R, Trenkwalder T, Kupatt C. Gene therapy for ischemic heart disease. *Expert opinion on biological therapy*. Jun 2011;11(6):723-737.
52. Gruchala M, Bhardwaj S, Pajusola K, et al. Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors. *The journal of gene medicine*. May 2004;6(5):545-554.
53. Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Human gene therapy*. Dec 2004;15(12):1157-1166.
54. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, et al. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature genetics*. Feb 1998;18(2):180-183.
55. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England journal of medicine*. Jan 16 2003;348(3):255-256.

56. Fleury S, Simeoni E, Zuppinger C, et al. Multiply attenuated, self-inactivating lentiviral vectors efficiently deliver and express genes for extended periods of time in adult rat cardiomyocytes in vivo. *Circulation*. May 13 2003;107(18):2375-2382.
57. Ng YS, D'Amore PA. Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease. *Current controlled trials in cardiovascular medicine*. 2001;2(6):278-285.
58. Takeshita S, Weir L, Chen D, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochemical and biophysical research communications*. Oct 14 1996;227(2):628-635.
59. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. Dec 22-29 1998;98(25):2800-2804.
60. Makinen K, Manninen H, Hedman M, et al. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. Jul 2002;6(1):127-133.
61. Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*. Oct 21 2003;108(16):1933-1938.
62. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. Jun 2008;16(6):1073-1080.
63. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Current topics in microbiology and immunology*. 1992;158:97-129.
64. Walz C, Deprez A, Dupressoir T, Durst M, Rabreau M, Schlehofer JR. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *The Journal of general virology*. Jun 1997;78 (Pt 6):1441-1452.
65. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *Journal of virology*. Jun 2004;78(12):6381-6388.
66. Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Current gene therapy*. Jun 2005;5(3):285-297.
67. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circulation research*. Aug 18 2006;99(4):e3-9.
68. Raake P, von Degenfeld G, Hinkel R, et al. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and

- percutaneous intramyocardial gene delivery. *Journal of the American College of Cardiology*. Sep 1 2004;44(5):1124-1129.
69. Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 15 1996;93(21):11288-11294.
 70. Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. Jul 2008;16(7):1189-1199.
 71. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics*. May 2003;4(5):346-358.
 72. Li H, Malani N, Hamilton SR, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood*. Mar 24 2011;117(12):3311-3319.
 73. Hinkel R, Trenkwalder T, Petersen B, et al. MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2. *Nature communications*. 2014;5:3970.
 74. Shimpo M, Ikeda U, Maeda Y, et al. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovascular research*. Mar 2002;53(4):993-1001.
 75. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jun 15 1992;89(12):5547-5551.
 76. Klein JJ, Goldstein AL, White A. Enhancement of in Vivo Incorporation of Labeled Precursors into DNA and Total Protein of Mouse Lymph Nodes after Administration of Thymic Extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 1965;53:812-817.
 77. Low TL, Goldstein AL. Chemical characterization of thymosin beta 4. *The Journal of biological chemistry*. Jan 25 1982;257(2):1000-1006.
 78. Hannappel E. beta-Thymosins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Sep 2007;1112:21-37.
 79. Huff T, Zerkawy D, Hannappel E. Interactions of beta-thymosins, thymosin beta 4-sulfoxide, and N-terminally truncated thymosin beta 4 with actin studied by equilibrium centrifugation, chemical cross-linking and viscometry. *European journal of biochemistry / FEBS*. Jun 1 1995;230(2):650-657.
 80. Safer D. The interaction of actin with thymosin beta 4. *Journal of muscle research and cell motility*. Jun 1992;13(3):269-271.
 81. Mannherz HG, Hannappel E. The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell motility and the cytoskeleton*. Oct 2009;66(10):839-851.

82. Reichert A, Heintz D, Voelter W, Mihelic M, Faulstich H. Polymerization of actin from the thymosin beta 4 complex initiated by the addition of actin nuclei, nuclei stabilizing agents or myosin S1. *FEBS letters*. Jun 27 1994;347(2-3):247-250.
83. Yarmola EG, Bubb MR. Effects of profilin and thymosin beta4 on the critical concentration of actin demonstrated in vitro and in cell extracts with a novel direct assay. *The Journal of biological chemistry*. Aug 6 2004;279(32):33519-33527.
84. Stossel TP, Fenteany G, Hartwig JH. Cell surface actin remodeling. *Journal of cell science*. Aug 15 2006;119(Pt 16):3261-3264.
85. Rubin BK, Kater AP, Goldstein AL. Thymosin beta4 sequesters actin in cystic fibrosis sputum and decreases sputum cohesivity in vitro. *Chest*. Nov 2006;130(5):1433-1440.
86. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*. May 2 2003;113(3):329-342.
87. Morita T, Mayanagi T, Sobue K. Reorganization of the actin cytoskeleton via transcriptional regulation of cytoskeletal/focal adhesion genes by myocardin-related transcription factors (MRTFs/MAL/MKLs). *Experimental cell research*. Oct 1 2007;313(16):3432-3445.
88. Medjkane S, Perez-Sanchez C, Gaggioli C, Sahai E, Treisman R. Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nature cell biology*. Mar 2009;11(3):257-268.
89. Kuwahara K, Teg Pipes GC, McAnally J, et al. Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity. *The Journal of clinical investigation*. May 2007;117(5):1324-1334.
90. Cassimeris L, Safer D, Nachmias VT, Zigmond SH. Thymosin beta 4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of cell biology*. Dec 1992;119(5):1261-1270.
91. Malinda KM, Sidhu GS, Mani H, et al. Thymosin beta4 accelerates wound healing. *The Journal of investigative dermatology*. Sep 1999;113(3):364-368.
92. Sosne G, Chan CC, Thai K, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo. *Experimental eye research*. May 2001;72(5):605-608.
93. Sosne G, Szliter EA, Barrett R, Kernacki KA, Kleinman H, Hazlett LD. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury. *Experimental eye research*. Feb 2002;74(2):293-299.
94. Sosne G, Qiu P, Christopherson PL, Wheeler MK. Thymosin beta 4 suppression of corneal NFkappaB: a potential anti-inflammatory pathway. *Experimental eye research*. Apr 2007;84(4):663-669.
95. Qiu P, Wheeler MK, Qiu Y, Sosne G. Thymosin beta4 inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation, IL-8 expression, and the sensitizing effects by its partners

PINCH-1 and ILK. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Jun 2011;25(6):1815-1826.

96. Badamchian M, Fagarasan MO, Danner RL, Suffredini AF, Damavandy H, Goldstein AL. Thymosin beta(4) reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock. *International immunopharmacology*. Aug 2003;3(8):1225-1233.
97. Lee JT. Antibiotic prophylaxis and surgical-wound infections. *The New England journal of medicine*. Jul 16 1992;327(3):205; author reply 206.
98. Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, et al. Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation*. Apr 29 2008;117(17):2232-2240.
99. Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, et al. Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *Journal of cell science*. Dec 1995;108 (Pt 12):3685-3694.
100. Grant DS, Rose W, Yaen C, Goldstein A, Martinez J, Kleinman H. Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis*. 1999;3(2):125-135.
101. Philp D, Huff T, Gho YS, Hannappel E, Kleinman HK. The actin binding site on thymosin beta4 promotes angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Nov 2003;17(14):2103-2105.
102. Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR. Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis*. 2007;10(4):229-241.
103. Jo JO, Kim SR, Bae MK, et al. Thymosin beta4 induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha-dependent manner. *Biochimica et biophysica acta*. Nov 2010;1803(11):1244-1251.
104. Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Sep 2007;1112:171-188.
105. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. Feb 14 1997;275(5302):964-967.
106. Qiu FY, Song XX, Zheng H, Zhao YB, Fu GS. Thymosin beta4 induces endothelial progenitor cell migration via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology*. Mar 2009;53(3):209-214.
107. Lv S, Cheng G, Zhou Y, Xu G. Thymosin beta4 induces angiogenesis through Notch signaling in endothelial cells. *Molecular and cellular biochemistry*. Sep 2013;381(1-2):283-290.

108. Rossdeutsch A, Smart N, Dube KN, Turner M, Riley PR. Essential role for thymosin beta4 in regulating vascular smooth muscle cell development and vessel wall stability. *Circulation research*. Aug 3 2012;111(4):e89-102.
109. Hall-Glenn F, De Young RA, Huang BL, et al. CCN2/connective tissue growth factor is essential for pericyte adhesion and endothelial basement membrane formation during angiogenesis. *PloS one*. 2012;7(2):e30562.
110. Hanna M, Liu H, Amir J, et al. Mechanical regulation of the proangiogenic factor CCN1/CYR61 gene requires the combined activities of MRTF-A and CREB-binding protein histone acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry*. Aug 21 2009;284(34):23125-23136.
111. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. Dec 27 1996;87(7):1161-1169.
112. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. Jul 4 1997;277(5322):55-60.
113. Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circulation research*. Oct 1997;81(4):567-574.
114. Fiedler U, Krissl T, Koidl S, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *The Journal of biological chemistry*. Jan 17 2003;278(3):1721-1727.
115. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in immunology*. Dec 2006;27(12):552-558.
116. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. Dec 27 1996;87(7):1171-1180.
117. Partanen J, Armstrong E, Makela TP, et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Molecular and cellular biology*. Apr 1992;12(4):1698-1707.
118. Woo KV, Qu X, Babaev VR, et al. Tie1 attenuation reduces murine atherosclerosis in a dose-dependent and shear stress-specific manner. *The Journal of clinical investigation*. Apr 2011;121(4):1624-1635.
119. Asahara T, Chen D, Takahashi T, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation research*. Aug 10 1998;83(3):233-240.
120. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature medicine*. Apr 2000;6(4):460-463.
121. Jeansson M, Gawlik A, Anderson G, et al. Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *The Journal of clinical investigation*. Jun 2011;121(6):2278-2289.

122. Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Developmental cell*. Jan 2008;14(1):25-36.
123. Mammoto T, Parikh SM, Mammoto A, et al. Angiopoietin-1 requires p190 RhoGAP to protect against vascular leakage in vivo. *The Journal of biological chemistry*. Aug 17 2007;282(33):23910-23918.
124. Wang Y, Pampou S, Fujikawa K, Varticovski L. Opposing effect of angiopoietin-1 on VEGF-mediated disruption of endothelial cell-cell interactions requires activation of PKC beta. *Journal of cellular physiology*. Jan 2004;198(1):53-61.
125. Oubaha M, Gratton JP. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC zeta contributes to angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro. *Blood*. Oct 8 2009;114(15):3343-3351.
126. Fuxe J, Tabruyn S, Colton K, et al. Pericyte requirement for anti-leak action of angiopoietin-1 and vascular remodeling in sustained inflammation. *The American journal of pathology*. Jun 2011;178(6):2897-2909.
127. Zhang J, Fukuhara S, Sako K, et al. Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of beta-catenin. *The Journal of biological chemistry*. Mar 11 2011;286(10):8055-8066.
128. Tadros A, Hughes DP, Dunmore BJ, Brindle NP. ABIN-2 protects endothelial cells from death and has a role in the antiapoptotic effect of angiopoietin-1. *Blood*. Dec 15 2003;102(13):4407-4409.
129. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. Jun 1 2004;103(11):4150-4156.
130. Hegen A, Koidl S, Weindel K, Marme D, Augustin HG, Fiedler U. Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Oct 2004;24(10):1803-1809.
131. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. May 28 1999;274(22):15732-15739.
132. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *Journal of cell science*. Feb 15 2005;118(Pt 4):771-780.
133. Hammes HP, Lin J, Wagner P, et al. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes*. Apr 2004;53(4):1104-1110.

134. Holopainen T, Saharinen P, D'Amico G, et al. Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*. Mar 21 2012;104(6):461-475.
135. Eklund L, Saharinen P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental cell research*. May 15 2013;319(9):1271-1280.
136. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, et al. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood*. Nov 11 2010;116(19):4025-4033.
137. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. Jul 4 1997;277(5322):48-50.
138. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature medicine*. Feb 2006;12(2):235-239.
139. Reiss Y, Droste J, Heil M, et al. Angiopoietin-2 impairs revascularization after limb ischemia. *Circulation research*. Jul 6 2007;101(1):88-96.
140. Qin D, Trenkwalder T, Lee S, et al. Early vessel destabilization mediated by Angiopoietin-2 and subsequent vessel maturation via Angiopoietin-1 induce functional neovasculature after ischemia. *PloS one*. 2013;8(4):e61831.
141. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and biophysical research communications*. Jun 30 1988;153(3):1251-1256.
142. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American journal of physiology*. Mar 1998;274(3 Pt 2):H1054-1058.
143. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*. Feb 18 1997;95(4):1030-1037.
144. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Aug 1995;15(8):1255-1261.
145. Wu HM, Yuan Y, McCarthy M, Granger HJ. Acidic and basic FGFs dilate arterioles of skeletal muscle through a NO-dependent mechanism. *The American journal of physiology*. Sep 1996;271(3 Pt 2):H1087-1093.
146. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Jul 1999;55(8-9):1078-1087.
147. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *The Journal of clinical investigation*. Nov 1994;94(5):2036-2044.

148. Matsunaga T, Warltier DC, Weihrauch DW, Moniz M, Tessmer J, Chilian WM. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation*. Dec 19 2000;102(25):3098-3103.
149. Ebong EE, Lopez-Quintero SV, Rizzo V, Spray DC, Tarbell JM. Shear-induced endothelial NOS activation and remodeling via heparan sulfate, glypican-1, and syndecan-1. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. Mar 2014;6(3):338-347.
150. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, et al. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *The Journal of biological chemistry*. Feb 13 1998;273(7):4220-4226.
151. Pfosser A, Thalgott M, Buttner K, et al. Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia. *Cardiovascular research*. Feb 15 2005;65(3):728-736.
152. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. Nov 1 1995;92(9 Suppl):II365-371.
153. Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *The American journal of pathology*. Aug 1998;153(2):381-394.
154. Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, et al. TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow. *Circulation*. Mar 1 1996;93(5):879-888.
155. Dorsaz PA, Doriot PA, Dorsaz L, Chatelain P, Rutishauser W. A new densitometric approach to the assessment of mean coronary flow. *Investigative radiology*. Apr 1997;32(4):198-204.
156. Lebherz C, von Degenfeld G, Karl A, et al. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium : journal of endothelial cell research*. 2003;10(4-5):257-265.
157. Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *The American journal of physiology*. May 1999;276(5 Pt 2):H1801-1806.
158. Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovascular research*. Dec 1984;18(12):724-732.
159. Brown MD, Hudlicka O. Protective effects of long-term bradycardial pacing against catecholamine-induced myocardial damage in rabbit hearts. *Circulation research*. May 1988;62(5):965-974.
160. Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *The American journal of pathology*. Sep 1992;141(3):673-683.

161. Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. Oct 2001;222(2):218-227.
162. Ozerdem U, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan expression by pericytes in pathological microvasculature. *Microvascular research*. Jan 2002;63(1):129-134.
163. Talarek S, Listos J, Fidecka S. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on benzodiazepine withdrawal in mice and rats. *Pharmacological reports : PR*. 2011;63(3):680-689.
164. Luszczki JJ, Jaskolska A, Dworzanski W, Zolkowska D. 7-Nitroindazole, but not NG-nitro-L-arginine, enhances the anticonvulsant activity of pregabalin in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *Pharmacological reports : PR*. 2011;63(1):169-175.
165. Pinkenburg O, Pfosser A, Hinkel R, et al. Recombinant adeno-associated virus-based gene transfer of cathelicidin induces therapeutic neovascularization preferentially via potent collateral growth. *Human gene therapy*. Feb 2009;20(2):159-167.
166. Ziegler T, Horstkotte J, Schwab C, et al. Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis. *The Journal of clinical investigation*. Jul 1 2013.
167. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T. Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Human gene therapy methods*. Apr 2013;24(2):59-67.
168. Gyorgy B, Fitzpatrick Z, Crommentuijn MH, Mu D, Maguire CA. Naturally enveloped AAV vectors for shielding neutralizing antibodies and robust gene delivery in vivo. *Biomaterials*. Aug 2014;35(26):7598-7609.
169. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Human gene therapy*. Jun 2010;21(6):704-712.
170. Dragneva G, Korpisalo P, Yla-Herttuala S. Promoting blood vessel growth in ischemic diseases: challenges in translating preclinical potential into clinical success. *Disease models & mechanisms*. Mar 2013;6(2):312-322.
171. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature medicine*. Mar 2006;12(3):342-347.
172. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*. Jul 4 2013;122(1):23-36.
173. Gossen M, Bujard H. Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annual review of genetics*. 2002;36:153-173.

174. Cawthorne C, Swindell R, Stratford IJ, Dive C, Welman A. Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. Apr 2007;18(2):120-123.
175. Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, et al. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood*. Mar 29 2012;119(13):3038-3041.
176. Zhou X, Vink M, Klaver B, Berkhout B, Das AT. Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene therapy*. Oct 2006;13(19):1382-1390.
177. Pfosser A, El-Aouni C, Pfisterer I, et al. NF kappaB activation in embryonic endothelial progenitor cells enhances neovascularization via PSGL-1 mediated recruitment: novel role for LL37. *Stem cells*. Feb 2010;28(2):376-385.
178. Anders K, Buschow C, Charo J, Blankenstein T. Depot formation of doxycycline impairs Tet-regulated gene expression in vivo. *Transgenic research*. Oct 2012;21(5):1099-1107.
179. Tressel SL, Kim H, Ni CW, et al. Angiopoietin-2 stimulates blood flow recovery after femoral artery occlusion by inducing inflammation and arteriogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Nov 2008;28(11):1989-1995.
180. Brudno Y, Ennett-Shepard AB, Chen RR, Aizenberg M, Mooney DJ. Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation factors. *Biomaterials*. Dec 2013;34(36):9201-9209.
181. Trenkwalder T. *Thymosin β 4 vermittelte Neovaskulisierung: transkriptionelle und posttranslationale Signalwege* [Dissertation]: Cardiology, Ludwig-Maximilians-Universität München; 2014.
182. Lohr NL, Ninomiya JT, Warltier DC, Weihrauch D. Far red/near infrared light treatment promotes femoral artery collateralization in the ischemic hindlimb. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Sep 2013;62:36-42.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Kupatt für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die stets konstruktiven Diskussionen zur Interpretation der Ergebnisse.

In besonderem Maße bedanke ich mich bei Dr. Rabea Hinkel für ihre intensive Betreuung. Ihr Elan, zahlreiche Diskussionen über Methoden und Ergebnisse sowie die Unterstützung in den Tierversuchen waren eine sehr geschätzte Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Meinen Vorgängern Franziska Götz, Georg Stachel und insbesondere Teresa Trenkwalder gilt mein herzlicher Dank für die Einarbeitung in die Methoden, die freundschaftliche Unterstützung über den Rahmen dieser Arbeit hinaus und viele gute Gespräche.

Seungmin Lee gebührt herzlicher Dank für das Klonen der Vektoren. Herrn Tien-Cuong Kieu und Frau Elisabeth Raatz danke ich für die exzellente technische Assistenz und Einarbeitung in neue Methoden.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl gilt mein Dank für die Bereitstellung des Tier-OPs im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin. Vielen Dank auch an Frau B. Blount und ihrem Team im Tierstall für die fürsorgliche Betreuung der Tiere.

Besonderer Dank gebührt meiner Patentante Marlis Finck für die viele Zeit, welche sie im Zusammenhang mit dieser Arbeit für mich aufbrachte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern für die großartige Unterstützung und Motivation sowie die aufgebrachte Geduld über die gesamte Zeit hinweg bedanken.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

Geseenhues, Florian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Mechanismen der Thymosin- β 4 - induzierten Gefäßneubildung im ischämischen Kaninchen-Hinterlauf-Modell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand